

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene des Fachbereiches
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. Hans-Jürgen Sinell

und

dem Institut für Veterinärmedizin (Robert v. Ostertag-Institut)
des Bundesgesundheitsamtes Berlin

Direktor: Prof. Dr. Dieter Großklaus

Versuche zur Eignung des Mäuseuterusgewichtstestes mit
juvenilen und ovariectomierten juvenilen Mäusen
zum Nachweis östrogen wirkender Stoffe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Annelie Hahn
Tierärztin aus Gronau/Hann.

Berlin 1972
Journal-Nr. 792



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene des Fachbereiches
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. Hans-Jürgen Sinell

und

dem Institut für Veterinärmedizin (Robert v. Ostertag-Institut)
des Bundesgesundheitsamtes Berlin

Direktor: Prof. Dr. Dieter Großklaus

Versuche zur Eignung des Mäuseuterusgewichtstestes mit
juvenilen und ovariektomierten juvenilen Mäusen
zum Nachweis östrogen wirkender Stoffe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
A n n e l i e H a h n
Tierärztin aus Gronau/Hann.

Berlin 1972
Journal-Nr. 792

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorsitzender:	Prof. Dr. H.-J. Sinell
Referent:	Prof. Dr. H.-J. Sinell
Korreferent:	Prof. Dr. G. Reuter



Tag der Promotion: 12. Juli 1972

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
1. Einleitung	5
2. Literatur	6
2.1. Was sind Östrogene	6
2.1.1. Natürliche, im lebenden Organis- mus vorhandene Östrogene	6
2.1.2. Phytoöstrogene; natürliche, im pflanzlichen Organismus vorhandene Östrogene	7
2.1.3. Synthetische Östrogene	8
2.2. Warum werden Östrogene in der Mast angewendet	13
2.2.1. Ziel der Anwendung	13
2.2.2. Wirkung der Östrogene	13
2.2.3. Vorteile einer Östrogenmast	14
2.2.4. Wirtschaftliche und lebens- mittelrechtliche Aspekte des Einsatzes von Östrogenen in der Mast	15
2.3. Verteilung im Organismus, Metaboli- sierung und Ausscheidung	17
2.4. Akute und chronische Gefährdung des Konsumenten durch Rückstände	19
2.5. Nachweismethoden	20
2.5.1. Chemische Nachweismethoden	20
2.5.2. Histologische Nachweismethoden	22
2.5.3. Biologische Nachweismethoden	23
3. Eigene Untersuchungen	26
3.1. Material und Methoden	26
3.1.1. Versuchsplanung	26
3.1.2. Versuchstiere (n.o. und o. Mäuse)	26
3.1.3. Untersuchte Materialien	30
3.1.4. Versuchsanordnung	32
3.1.5. Auswertung	33

	Seite
3.2. Ergebnisse und Besprechung	34
3.2.1. Grundfutter	35
3.2.2. Kot; Inhalt verschiedener Darm- abschnitte; Gallenflüssigkeit	36
3.2.3. Organe: Leber, Niere	38
3.2.4. Fleisch	39
4. Diskussion	64
5. Zusammenfassung	77
6. Summary	78
7. Literaturverzeichnis	79

1. E i n l e i t u n g

In der Bundesrepublik Deutschland, sowie in den übrigen Mitgliedstaaten der EWG, ist seit einiger Zeit die illegale Anwendung östrogen wirksamer Substanzen als Masthilfsmittel in der Kälbermast ein aktuelles Problem. Vorteile der "Östrogenmast" sind höhere Wachstumsraten bei besserer Futterausnutzung. Als Applikationsart kommen orale und intramuskuläre Verabreichung, jedoch auch die Implantation von Pellets in Frage.

Der Gesetzgeber in der Bundesrepublik Deutschland hat den Konsumenten vor Hormonrückständen in Schlachttieren zu schützen versucht. § 4 b Absatz 2 des Lebensmittelgesetzes vom 21. 12. 1958 in der Fassung vom 23. 6. 1964 verbietet, lebenden Tieren Stoffe mit östrogenen Wirkung einzupflanzen, einzuspritzen oder unvermischt oder nach Vermischung mit Futtermitteln oder anderen Stoffen zu verabfolgen, um die Beschaffenheit des Fleisches oder den Fleisch- oder Fettansatz zu beeinflussen.

Die Beachtung dieses Verbotes ist jedoch nur dann wirksam zu überwachen, wenn geeignete Kontrolluntersuchungen existieren, von denen Reproduzierbarkeit, Sicherheit, Eindeutigkeit und Einfachheit für die Routineuntersuchung zu verlangen ist. Von den biologischen Nachweisverfahren auf östrogen wirkende Rückstände wurde der Mäuseuterusgewichtstest nach UMBERGER, GASS und CURTIS (1958), modifiziert nach KARG (1969) als Screening-Test vor der EWG-Kommission empfohlen. Bei Nachprüfung durch andere Untersucher erwies sich diese Methode nicht in jedem Falle als zuverlässig (GODGLÜCK und SIEWERT 1971, HÖPKE 1971, KLEIN 1972).

Die vorliegenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um den Aussagewert des Mäuseuterusgewichtstestes (MUGT) mit juvenilen Mäusen zu prüfen. Zum Vergleich wurden Parallelversuche mit ovariectomierten Mäusen angesetzt.

2. Literatur

2.1. Was sind Östrogene

Der Begriff "Östrogene" umfaßt eine Vielfalt von Verbindungen, die gleiche biologische Wirkung haben wie das in den Ovarien gebildete Hormon und beim weiblichen Nager einen Östrus hervorrufen, jedoch unterschiedliche chemische Struktur aufweisen können (MØLLER 1966).

2.1.1. Natürliche, im lebenden Organismus vorhandene Östrogene

Natürliche Östrogene sind körpereigene Stoffe, die mit den Androgenen, Gestagenen und Corticoiden zu der Gruppe der Steroidhormone gehören und denen das Cyclo-pentano-perhydrophenantren Skelett zugrunde liegt.

Die Bildungsstätten dieser C_{18} -Steroide sind im weiblichen Organismus das Ovar und die Placenta, in geringen Mengen auch die Nebennierenrinde.

Nach AMMON und DIRSCHERL 1960 und ROMMEL 1963 kommen für die Biosynthese der Östrogene drei Möglichkeiten in Betracht, die aber nur auf Hypothesen beruhen:

- a) Abbau von Cholesterin zu Cholesterinester als Vorstufe der Östrogene
- b) Synthese aus Essigsäure zu Östron und β -Östradiol im Eierstock
- c) Bildung der Östrogene aus Androgenen in Ovar und Placenta

Nach KARLSON 1966 ist die letzt genannte Möglichkeit von großer Wahrscheinlichkeit. Er nimmt an, daß die Bildung der Östrogene über Hydroxylierung und Dehydrierung vom Testosteron ausgeht.

Die Hauptvertreter der körpereigenen Östrogene sind das Östron, das 17β -Östradiol und das Östriol-3,16 α ,17 β .

Im Organismus ist ein Übergang dieser einzelnen Östrogene ineinander möglich, wobei Östron und Östriol als Stoffwechselprodukte des Östradiol gelten.

DOISY und BUTENANDT 1929 sowie LAQUEUR 1930 gelang es fast gleichzeitig das Follikelhormon, später Östron genannt, aus Schwangerenurin rein darzustellen.

Heute ist die Synthese der meisten natürlichen, steroiden Östrogene gelungen.

2.1.2. Phytoöstrogene; natürliche, im pflanzlichen Organismus vorhandene Östrogene

Phytoöstrogene sind in ihrer Funktion als Blüh- und Keimhormone Pflanzeninhaltsstoffe mit Östrogenaktivität.

Ihr mengenmäßiges und zeitliches Auftreten in den einzelnen Pflanzenorganen verläuft mit dem allgemeinen Gehalt an lipoidlöslichen Substanzen parallel.

SCHOOP und KLETTE 1955 unterscheiden Pflanzenöstrogene steroider Natur, wie z.B. die seltener vorkommenden Steroide Östron, Östriol und Miröstrol und die häufigeren Pflanzenöstrogene phenolischer Natur. Beispiele dieser Art sind die Isoflavone und deren Abkömmlinge Genistein (in der Luzerne) und Biochanin A, die Cumarine (als Cumestrol in der Luzerne), die Naphthalene und die Stilbene.

Sie unterscheiden sich nicht nur in der chemischen Struktur, sondern auch in ihrer Wirksamkeit im Organismus.

Phytoöstrogene vom Steroid-typ werden bei oraler Verabreichung nur wenig resorbiert und unterliegen, ähnlich den natürlichen Östrogenen, Umwandlungsprozessen in der Leber zu ausscheidungsfähigen, wasserlöslichen Verbindungen, wie z.B. Östrogenglucuronsäure bzw. Östrogen-Schwefelsäure-Konjugaten.

Im Gegensatz dazu werden Phytoöstrogene phenolischer Natur nicht oder nur wenig von der Leber abgebaut und sind daher von großer oraler Wirksamkeit (GRAB 1939, SCHOOP und KLETTE 1955).

Ein Vergleich des in der Kleeart *Trifolium subterraneum* enthaltenen Isoflavons Genistein mit dem natürlichen Östrogen β -Östradiol macht jedoch die Größenordnungen deutlich, in denen Phytoöstrogene wirksam sind.

Die wirksamen Dosen verhalten sich im Allen-Doisy-Test

Genistein zu β -Östradiol und auch zu dem synthetischen Östrogen Diäthylstilböstrol wie 1 : 10^{-5} bis 10^{-6} .

Der Wirkungsmechanismus der Phytoöstrogene im Körper ist unbekannt. Nach KÜPFER 1970 wird angenommen, daß es sich, wie z.B. beim Isoflavon Genistein um Pro-Östrogene handelt, deren Metaboliten erst eigentlich aktiv werden und direkt auf die Erfolgsorgane wirken. Durch einen Feed-back-Mechanismus wird dann die Sekretion der hypophysären gonatropen Hormone gehemmt.

Nach KRAUSE 1969 besitzen folgende Pflanzen in mengenmäßig abfallender Reihe Östrogenaktivität: weißer Steinklee, Luzerne, Rotklee, Luzerne (Heu), Futtererbsen und Sommerwicken.

KÜPFER 1970 sind nur wenig Beobachtungen darüber bekannt, daß in den Futterpflanzen Mitteleuropas Phytoöstrogene in für Haustiere kritischen Konzentrationen vorkommen.

Allerdings wurde aus Westaustralien von Fortpflanzungsstörungen bei Schafen auf Grund von hohem Östrogengehalt in Erdkleesorten berichtet. In Israel traten nach Luzernefütterung Fruchtbarkeitsstörungen beim Rind auf (KRAUSE 1969).

2.1.3. Synthetische Östrogene

Außer den industriell hergestellten Abkömmlingen der natürlichen Östrogene Östradiol, Östrol und Östriol gibt es synthetische Östrogene, die eine ganz andere chemische Konfiguration besitzen.

Die synthetische Östrogenverbindung, die zur Zeit hauptsächlich verwendet wird, ist das von DODDS, GOLBERG, LAWSON und ROBINSON 1938 synthetisierte 4,4'-Dihydroxy- α , β -diäthylstilben. Die Erfinder nannten es "Stilböstrol" und das Diäthylderivat "Diäthylstilböstrol". In der Literatur wird jedoch Diäthylstilböstrol (DÄS) häufig als "Stilböstrol" bezeichnet.

Die für die Praxis wichtigsten Derivate dieser phenolischen Grundsubstanz sind das Hexöstrol und das Dienstrol, neuerdings auch das Zeranol.

Veresterungen dieser Grundsubstanz führen mit zunehmender Länge der veresternden Säure zu immer weiter gehender Verzögerung der Wirkung, denn erst nach Aufspaltung der Esterbindung wird die hormonelle Aktivität des Grundkörpers frei.

Ein Beispiel für ein verestertes, phenolisches Östrogen ist das Diäthylstilböstrol-dipropionat. Es weist im Organismus eine protrahierte Wirkung auf, ohne, wie die meisten anderen veresterten Östrogenverbindungen, Intensitätseinbußen zu zeigen (EULER 1968).

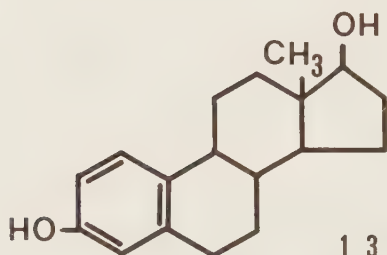
Alle synthetischen Östrogene phenolischer Struktur besitzen gute orale Wirksamkeit. Ähnlich den Phytoöstrogenen phenolischer Natur werden auch sie nicht von der Leber abgebaut.

Ihre Wirkung im Organismus ist völlig oder zu einem großen Teil mit der der natürlichen Östrogene identisch.

An der Ratte ist DÄS oral 2,5 mal stärker wirksam als Östron, jedoch etwas schwächer als Östradiol. (zit. n. AMMON und DIRSCHERL 1960). Dies gilt im Prinzip auch für die Maus.

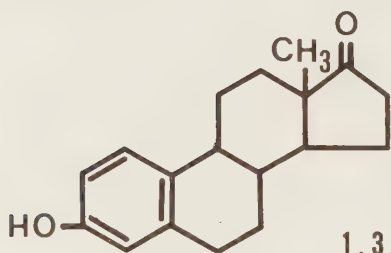
Die synthetischen Östrogene DÄS, Dienöstrol oder Hexöstrol kommen vorwiegend unter das Futter gemischt zur Anwendung, während in neuester Zeit zur Herstellung von Pellets vornehmlich Östradiol und Zeranol verwandt werden (KARG 1971).

Strukturformeln der natürlichen Östrogene



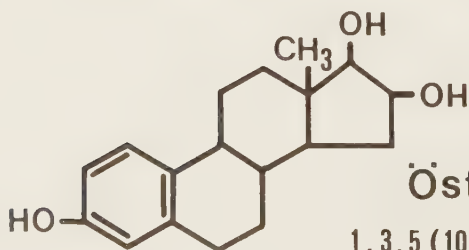
Östradiol

1, 3, 5 (10) - Östratrien - 3, 17 β - diol



Östron

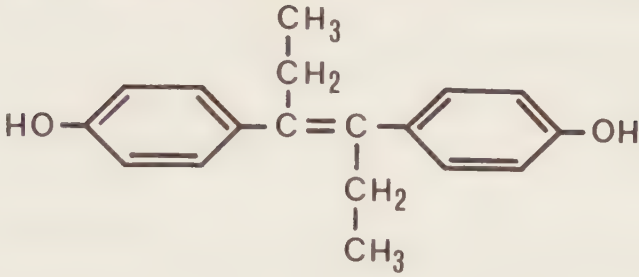
1, 3, 5, (10) - Östratrien - 17 - on



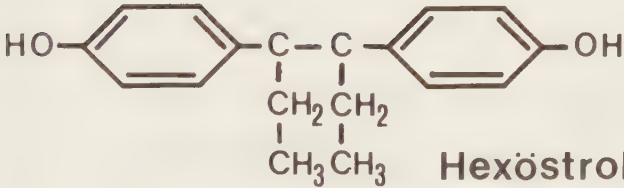
Östriol

1, 3, 5 (10) - Östratrien - 3, 16 α , 17 β - triol

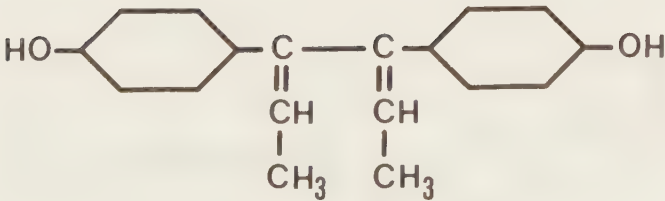
Strukturformeln der synth. Östrogene



Diäthylstilböstrol



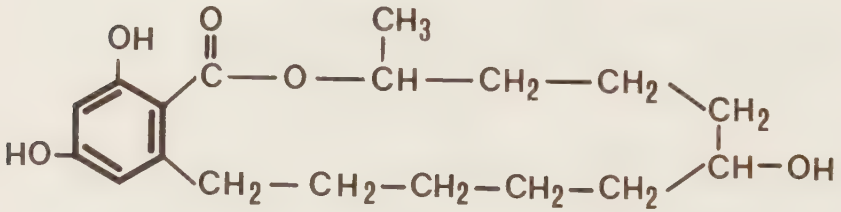
Hexöstrol



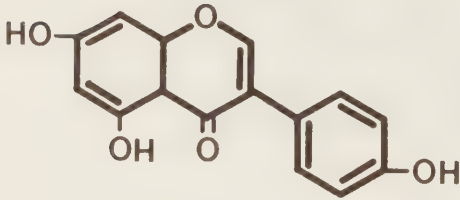
Dienöstrol

Zeranol

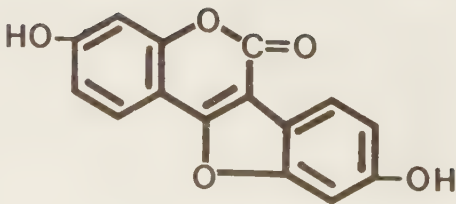
3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,-Decahydro-7,14,16-trihydroxy-3-methyl-
1 H-2-benzoxacyclotetradecin-1-on



Strukturformeln der Phytoöstrogene



Genistein



Cumestrol

2.2. Warum werden Östrogene in der Mast angewendet

2.2.1. Ziel der Anwendung

Bei der Anwendung von Östrogenen als sogenannte "Masthilfsmittel" wird die Wirkung des weiblichen Sexualhormons im Organismus ausgenutzt, um die Schlachtreife schneller zu erzielen.

2.2.2. Wirkung der Östrogene

Die Wirkung der Östrogene im genitalen Bereich sind von denen im extragenitalen Bereich zu unterscheiden.

Als genitale Wirkung sind die mit dem Follikelhormon auszulösenden Erscheinungen einer Brunst anzusehen. Dies kann sowohl bei normalen geschlechtsreifen, bei infantilen, bei kastrierten und bei senilen, weiblichen Tieren verursacht werden.

Als Brunsterscheinungen sind folgende Veränderungen anzusehen:

- a) Proliferation der Vaginaschleimhaut und der Uterusschleimhaut
- b) Wachstum des Uterus. Nach HOLDEN 1939 entsteht durch Hyperämie eine erhöhte Permeabilität der Uteruskapillaren und somit vermehrte Aufnahme extracellulärer Elektrolyte und Wasser (ASTWOOD 1938). So wurde bei der infantilen Ratte nach einmaliger Injektion von 0,5 ng Östradiol innerhalb von 24 Stunden eine Uterusgewichtszunahme um 120% beobachtet
- c) Hyperämie, Wachstum und Schleimhautproliferation der Tuben
- d) Gewichtszunahme des Ovars, besonders durch Follikelwachstum

Die extragenitalen Wirkungen der Östrogene sind sehr mannigfaltig und beeinflussen den gesamten Stoffwechsel. Anschließend sind einige Veränderungen genannt, die von

besonderem Interesse für die Östrogenmast und deren Nachweismethoden sind:

- a) Allgemeine mitogenetische Stimulierung
- b) Proliferation der Mamma
- c) Grundumsatzsteigerung bei kleinen Gaben von Östrogenen
- d) Förderung der Wasserresorption aus dem Darm
- e) Förderung der Na-Resorption im Mineralstoffwechsel
- f) Bei Gabe von kleinen Dosen Östrogen Förderung der Knochenbildung durch Retention von Calcium und Phosphat bei gleichzeitig herabgesetzter Ausscheidung
- g) Förderung des Glykogenaufbaus auf Grund der schwach glykostatischen Wirkung der Östrogene
- h) Förderung der Lipidsynthese. Besonders bei Hühnern haben STAMLER und Mitarb. 1950 nach Gabe von DÄS eine Erhöhung der Phosphorlipide im Blut und einen Anstieg der Fettsäuren und des Cholesterin festgestellt
- i) N-retinierende und proteinanabole Wirkung
- j) Hyperplasie der Hypophyse und Aktivitätszunahme des Hypophysenvorderlappens. Es wird daraus auf eine vermehrte Ausscheidung von STH und/oder ACTH geschlossen (EULER 1968)

2.2.3. Vorteile einer Östrogenmast

Aus den oben dargelegten extragenitalen Wirkungen im Organismus resultieren die Vorteile einer Östrogenmast. Durch erhöhte Gewichtszunahme und bessere Futterausnutzung wird eine verkürzte Mastdauer erreicht. Dabei ist diese "anabole" Wirkung in großem Maße dosisabhängig. Kleine Gaben von Östrogenen stimulieren die Gewichtszunahme, während eine Verabreichung hoher Dosen den gegenteiligen Effekt hat. Es tritt eine Wachstumsdepression auf bei gleichzeitiger Lipogenese (KARG 1966).

So hat EVANS 1936 und LICHTWITZ 1951 bei niedrigen Östrogengaben eine Vermehrung der eosinophilen Zellen im Hypophysenvorderlappen festgestellt, während hohe Dosen eine Abnahme dieser Zellen verursachten.

Daraus folgern einige Autoren (Herlant 1952/1955, CLEGG u. COLE 1954, CAIRY 1955, TURNER 1955, BRÜGGEMANN u. KARG

1959), daß es durch Hyperplasie der Hypophyse zu vermehrter Ausschüttung des Wachstumshormons STH und des adreno-corticotropen Hormons ACTH kommt. Sie erklären so die protein-anabole Wirkung der Östrogenmast.

Andere Autoren (STAEMLER 1965) erklären den Masteffekt durch die Mitose fördernde Wirkung der Östrogene.

Nach KARG 1971 tritt die anabole Wirkung der Östrogene um so deutlicher in Erscheinung, je niedriger der Spiegel an endogenem Hormon zum Zeitpunkt der Östrogenverabreichung ist.

In der Rindermast bewirken Östrogengaben, im Gegensatz zur Hühnermast, keine Stimulierung des Lipoidstoffwechsels (KOCH 1955, LORENZ 1954), sondern zeigen in niedriger Dosierung einen rein proteinanabolen Effekt zugunsten des Fleischansatzes ohne vermehrte Fettbildung (LERCHE, SINELL 1959, KARG 1966). Bei verbesserten Gewichtszunahmen und besserer Futterverwertung wurde jedoch eine geringere Schlachtausbeute aufgrund erhöhter Füllgewichte des Magen-Darmtraktes beobachtet (SINELL 1964, PRÄNDL 1964).

2.2.4. Wirtschaftliche und lebensmittelrechtliche Aspekte des Einsatzes von Östrogenen in der Mast

Sowohl in Deutschland als auch in den übrigen EWG-Staaten und in den USA ist ein starker Anstieg des jährlichen pro-Kopf-Verbrauches vom Tier stammender Lebensmittel, vornehmlich von Fleisch, zu verzeichnen (GASSNER, MARTIN, ALGEO 1959, BRÜGGEMANN, KARG 1959). Bei den Fleischsorten bevorzugt der Verbraucher heute die mageren Qualitäten, insbesondere Kalbfleisch, Rindfleisch und Geflügelfleisch (GASSNER et al. 1959). Um den Nahrungsmittelwünschen der Bevölkerung zu entsprechen hat man nach Möglichkeiten gesucht, die Fleischproduktion und die Fleischqualität zu steigern, ohne dem Konsumenten erhebliche Kosten aufzuerlegen (AGRA-EUROPE, 30/1971). Als eine Lösung dieses Problems erwies sich die Gabe von Zusatzfuttermitteln, die eine bessere Ausnutzung der zugeführten Nährstoffe Eiweiß, Kohlenhydrate und Fette erbrachte. Neben Antibiotika, Arsenikalien, Antioxydantien und anderen pharmakologisch wirksamen Sub-

stanzen gehören auch die Hormone zu solchen medikamentös wirkenden Zusatzstoffen (GROßKLAUS 1971).

In der Hormonmast kommen die phenolischen Östrogene, unter ihnen das DÄS, am häufigsten zur Anwendung (ANDREWS 1954, CLEGG und COLE 1954, BRÜGGEMANN u. KARG 1959). Des weiteren Dienöstro1 und Hexöstro1 (STROB et al. 1954, ANDREWS et al. 1954), sowie verschiedene Kombinationspräparate mit vorwiegend steroiden Östrogenen (GASSNER et al. 1959). Beim Einsatz dieser synthetischen Östrogene spielt die Preisfrage eine große Rolle. DÄS kostet nur einen Bruchteil von dem, was für natürliche Östrogene zu zahlen wäre (GASSNER et al. 1959). Daher erhalten von den rund 90 % der mit Sexualhormon in den USA gefütterten Mastrinder 80-85% DÄS (AGRA-EUROPE 30/1971).

Der Einsatz von Sexualhormonen in der Mast ist in den USA von der Food and Drug Administration legalisiert worden, sofern die Maximaldosis 10 mg DÄS/Tier/Tag nicht übersteigt und der Stoff 48 Stunden vor der Schlachtung abgesetzt wird (CAIRY 1955, GASSNER et al. 1959). Durch diese Maßnahme soll der Konsument vor Östrogenrückständen im Fleisch bewahrt werden (KARG 1963).

In der Bundesrepublik Deutschland ist es nach § 4 b Absatz 2 des Lebensmittelgesetzes vom 21. 12. 1958 in der Fassung vom 23. 6. 1964 verboten, lebenden Tieren Stoffe mit östrogener Wirkung einzupflanzen, einzuspritzen oder unvermischt oder nach Vermischung mit Futtermitteln oder anderen Stoffen zu verabfolgen, um die Beschaffenheit des Fleisches oder den Fleisch- oder Fettansatz zu beeinflussen.

Eine Begründung für dieses Verbot liegt ebenfalls in dem Einwand gegenüber möglichen hygienischen oder toxikologischen Gefahren für den Menschen (THIEL 1964, KOTTER 1964, VUILLAUME 1970, GODGLÜCK 1971, GRÄTZ u. BIRKNER 1972, BRÜHANN 1972).

2.3. Verteilung im Organismus, Metabolisierung und Ausscheidung

Über den Stoffwechsel der Östrogene sind die derzeitigen Kenntnisse noch recht lückenhaft.

Bekannt ist, daß die natürlichen Östrogene in der Leber zu transport- und ausscheidungsfähigen Verbindungen umgewandelt werden, indem sie nach fermentativer Zerstörung an ein Protein gebunden oder durch Konjugation an Schwefel- oder Glucuronsäure in eine wasserlösliche Form gebracht werden (AMMON, DIRSCHERL 1960, KARLSON 1967). Jedoch sind viele Metaboliten, die nach einer inaktivierenden Umwandlung der Östrogene entstehen, noch unbekannter Zusammensetzung (BÄR 1963).

Experimentell wurde im Organismus ein Übergang der natürlichen Östrogene 17 β -Östradiol, Östron, 17 α -Östradiol und Östriol ineinander festgestellt. Nach DICZFALUSY 1953/1956 liegt nur ein kleiner Teil der Östrogene im Körper in gebundener Form vor.

Im Blut wird dem Albumin die Hauptfunktion im Östrogen-transport zugeschrieben. Ob dabei die Östrogene verändert werden, ist nicht einheitlich beantwortet. In Harn und Kot werden die Östrogene als Glucuronid (Mensch) bzw. als Sulfat (Stute) ausgeschieden. Nach Gaben von radioaktiv-markierten Östrogenen an Ratten wurden 87% der Radioaktivität in der Galle, der Rest im Harn, wiedergefunden. Daraus wird geschlossen, daß die Hauptmenge über die Galle im Kot ausgeschieden wird, ein kleinerer Teil über die Niere im Harn (SCHAARSCHMIDT 1969). Ein geringer Teil wird auch über die Milch ausgeschieden. POPE u. ROY 1953 fanden Östrogene im Colostrum des Rindes und SCHAFFENBERG et al. 1954 konnte im Bullensperma Östrogene biologisch nachweisen. Während des Zyklus scheidet das Rind von den natürlichen Östrogenen hauptsächlich 17 α -Östradiol aus (HAMMER 1965). In der Trächtigkeit nimmt die Menge von ausgeschiedenem Östron zu (ROMMEL 1963).

Bei der Maus wurde nach s.c. Injektion von C¹⁴-Östron Radioaktivität vor allem in den Ovarien und im Uterus aber

auch in Leber, Nebenniere, Knochen, Blut und Lymphknoten gefunden (TWOMBLEY u. SCHOENWALDT 1951).

Eine Erklärung dafür, daß die größten Mengen im Organismus in Ovarien und Uterus gefunden wurden, geben JENSEN et al. 1971. Sie behaupten, daß diese Gewebe zu solchen gehören, die spezifische Rezeptoren für Östrogene besitzen und in der Lage sind, das Hormon ohne chemische Umwandlung zu binden.

Synthetische Östrogene, wie z.B. das DÄS, unterliegen bei gleicher oder stärkerer pharmakologischer Wirkung einem anderen Abbau als die natürlichen Östrogene (MØLLER 1966). Ihre gute orale Wirksamkeit geht darauf zurück, daß sie nicht in der Leber abgebaut werden.

Über den weiteren Stoffwechsel dieser nicht steroiden, phenolischen synthetischen Östrogene ist wenig bekannt. Im Harn werden sie teils frei, teils als Monoglucuronid ausgeschieden. Hexöstrol z.B. wird bei Hund, Katze, Ratte und Mensch vorwiegend als Monoglucuronid, weniger als Sulfat oder in freier Form ausgeschieden. Bei Verabreichung von hydroxylfreien Östrogenen, wie z.B. Stilben, traten im Harn entsprechende Hydroxyverbindungen auf, die darauf schließen lassen, daß eine Oxydation stattgefunden hat (STROUD 1940). DÄS wurde nach radioaktiver Markierung in der Hauptmenge in Galle und Kot, weniger im Harn, aber auch in der Leber wiedergefunden. Eine Speicherung der synthetischen Östrogene wurde im Körperfett von behandelten Frauen nachgewiesen (AMMON u. DIRSCHERL 1960).

KOCH 1949 hat bei Hähnchen eine Speicherung in Geweben mit hohem Lipoidgehalt und in der Leber festgestellt.

NEUHOFF 1952 fand bei Rückstandsuntersuchungen an behandelten Kapaunen die größte Menge östrogener Substanzen in der Unterhaut. GASSNER et al. 1959 konnte in Muskulatur, Leber, Haut und Bauchfett von behandeltem Geflügel meßbare Hormonrückstände feststellen. Bei den behandelten Rindern, Schafen und Schweinen konnten keine DÄS-Rückstände festgestellt werden. SCHRÖDER 1965 berichtet von ähnlichen Ergebnissen beim Geflügel. Bei Kühen, die mit Dienöstrol gemästet wurden, wies nur das Fettgewebe, im besonderen das Eingeweide-

fett, östrogene Aktivität auf (KOCH u. HEIM 1955).

THIEL und SCHAAL 1962 konnten nicht in Leber- oder Fettextrakten, jedoch in Muskelextrakten, nicht im Muskelgewebe, vorausgegangene Hormonbehandlung beim Geflügel nachweisen. HUIS IN'T VELD 1967 et. al. berichtet über Rückstände, vor allem in Urin und im Fleisch aus dem näheren Bereich der Injektionsstelle, sowie in der Niere.

2.4. Akute und chronische Gefährdung des Konsumenten durch Rückstände

Eine akute Gefährdung des Konsumenten durch den Verzehr von hormonhaltigem Fleisch besteht nach allgemeiner Auffassung nicht (BORNSCHEIN 1952, KOCH u. HEIM 1953, GASSNER et al. 1959). Es wird jedoch vorausgesetzt, daß nicht gerade die Implantationsstelle zum Verzehr gelangt. Das übrige Fleisch enthält nach KOCH und HEIM 1953 so geringe Hormonkonzentrationen, daß akute gesundheitliche Schäden beim Menschen nicht im Bereich des Wahrscheinlichen liegen. LAWRIE 1959 äußert gewisse Bedenken hinsichtlich der Rückstandskonzentrationen, besonders wenn die Implantation des Pellets nicht am Ohrgrund oder an anderen Stellen (Klauenspalt), die bei der Schlachtung mit Sicherheit entfernt werden, erfolgt.

BÄR 1963 weist besonders darauf hin, daß eine Person bei täglichem Verzehr selbst größerer Mengen von Leber, Nieren und anderen Organen von mit Östrogen behandelten Tieren immer nur Minimaldosen aufnehmen würde. Jedoch schließt er die Möglichkeit einer cancerogenen Gefahr oder Hormonwirkung beim Menschen, z.B. bei Frauen in der Menopause, nicht aus, zumal Östrogene durch Kochen nicht zerstört werden. So könnten sie selber bzw. ihre Metaboliten kumulativ wirksam sein. BUTENANDT 1950 nennt das Follikelhormon einen "bedingt krebsauslösenden Stoff mit spezifisch organotroper Wirkung". KARG et al. 1969/1971 äußert sich auf Grund der möglichen Verbrauchergefährdung ablehnend gegenüber der Verwendung von DÄS.

2.5. Nachweismethoden

Durch das Verbot der Anwendung von Stoffen mit östrogener Wirkung in § 4 b Absatz 2 des Lebensmittelgesetzes (LMG) ist es nötig geworden, eine forensische Beweisführung durch sichere Nachweismethoden zu ermöglichen.

Die zur Zeit in der Praxis angewendeten Nachweismethoden sind chemischer, histologischer und biologischer Art.

Anschließend wird kurz auf diese drei Nachweisverfahren eingegangen.

2.5.1. Chemische Nachweismethoden

Die Aufbereitung der Proben zum Zwecke der chemischen Identifikation des Wirkstoffes erfordert verschiedene Arbeitsgänge, je nachdem ob Kot, Urin, oder Fleisch zur Untersuchung vorliegen. In Abhängigkeit von der jeweiligen chemischen Verbindung existieren verschiedene, ausgearbeitete Nachweismethoden.

SCHULLER 1967 hat eine dünnschichtchromatographische Methode zum Nachweis von DÄS im Harn entwickelt, nach der noch etwa 0,05 ng DÄS/100 ml Urin nachgewiesen werden können (VOGT et al. 1970).

UMBERGER et al. 1963 erarbeitete eine quantitativ fluometrische Bestimmung von DÄS im Urin und im Hühnerfleisch. HUIS IN'T VELD 1969 und KARG et al. 1969 stellten Arbeitsvorschriften für die dünnschichtchromatographische Untersuchung von DÄS im Kot auf.

GOODYEAR u. JENKINSON 1961 und KARG et al. 1969 entwickelten ein Extraktionsverfahren, welches als Vorschrift für routinemäßige, dünnschichtchromatographische Untersuchungen auf DÄS-Rückstände im Fleisch angewandt wird. Auch HUIS IN'T VELD et al. 1967/1969 beschrieb ein dünnschichtchromatographisches Nachweisverfahren für Organe und Gewebe von Mastkälbern.

Im Jahre 1970 hat MALANOSKI für die Hormonverbindungen Diäthylstilböstrol, Medroxyprogesteronacetat, Chlormadinonacetat und Melengestrolacetat ein Extraktions- und Bestim-

nungsschema aufgestellt.

KRÖLLER 1971 hat in Anlehnung an die Methode von SCHULLER ein Verfahren zur Bestimmung von DÄS im Fleisch ausgearbeitet.

Vielversprechend ist die von WALDSCHMIDT 1971 referierte Methode eines einfachen, dünn-schichtchromatographischen Screening-Testes zur Differenzierung von Östrogenen in Extrakten. Das jeweilige Material (Urin, Kot, Implantat, Futter, Fleisch und Organe) wird nach einer besonders entwickelten Technik aufbereitet. Daran schließt sich der eigentliche dünn-schichtchromatographische Screening-Test mit der Extraktlösung an. Auf der Kieselgelplatte sind die einzelnen Östrogene durch ihren R_f -Wert, ihre Farbe und deren Veränderung während der Erhitzungszeit charakterisiert.

Der Vorteil dieser Methode ist, daß im Vergleich mit vorher ermittelten Standardwerten das jeweilige Östrogen identifiziert werden kann und das Ergebnis nach nur einem Arbeitsgang vorliegt. Die Nachweisgrenze beträgt für Hexöströl 0,5 ng, für die übrigen Östrogene wie DÄS, Dienöströl, 17 β /17 α Östradiol, Östron und Zeranol 0,2 ng. Schwierigkeiten in der Identifikation des östrogenen Stoffes können auftreten, wenn es nicht gelingt, den Extrakt völlig zu reinigen. Dies ist häufig bei der Extraktion von Kot aufgetreten.

Praktische Erfahrungen aus dem Routinebetrieb existieren mit dieser Methode noch wenig, da der Arbeitsaufwand verhältnismäßig hoch ist (GODGLÜCK u. SIEWERT 1971).

Die neuesten Mitteilungen liegen von VOGT et al., April 1972, vor, der über die Extraktion und chemischen Bestimmungsverfahren von Östradiol in Urin, Kot, Pellets und Fleisch, Leber und Niere vom Kalb berichtet. Er erfaßt mit dieser Methode sehr niedrige Ausscheidungskonzentrationen. Allerdings ist die chemische Identifikation des Hormons Östradiol mit der Schwierigkeit verbunden, eine exakte Aussage darüber zu machen, ob es sich um eine im Körper produzierte oder eine synthetische, dem Körper zugeführte, Verbindung handelt (KARG 1971).

2.5.2. Histologische Nachweismethoden

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß nach Östrogenapplikation an männliche oder weibliche, noch nicht geschlechtsreife Tiere histologisch nachweisbare Veränderungen am Mammagewebe und an den akessorischen Geschlechtsdrüsen auftreten.

Allgemein weisen die Epithelien der akessorischen Geschlechtsdrüsen nach Östrogenbehandlung metaplastische und hyperplastische Veränderungen auf (GRIFT, VAN DER 1967, SCHAARSCHMIDT 1969, KARG et al. 1970, THIEL 1971).

RUITENBERG et al. 1967/1970 haben als Screening-Test die histologische Untersuchung von Prostata und Bartholinischen Drüsen beschrieben und als schnell durchführbare Methode empfohlen. Weitere Untersuchungen liegen aus Holland von VAN DER GRIFT 1967 und KROES 1971 sowie VAN DER WAL et al. 1971 vor. HEINERT 1971 betont besonders, daß die histologische Nachweismethode von relativ geringem Arbeits- und Materialaufwand ist.

BIBRACK und BECK 1971 empfehlen zusätzlich die Untersuchung der Bulbourethraldrüsen, da die Veränderungen hier in höherem Grade ausgeprägt und in der Routineuntersuchung leichter zu beurteilen sind als die der Prostata. Die Autoren haben diese meta- und hyperplastischen Veränderungen an Drüsen- und Gangepithel auch mit Hilfe der PAS-Reaktion dargestellt.

Auch RUITENBERG et al. 1972 hebt den Wert der histologischen Nachweismethode auf Grund der Sicherheit in der Aussage und der Schnelligkeit gegenüber der biologischen und chemischen Nachweismethode hervor. Er gibt jedoch zu bedenken, daß im Rahmen des zwischenstaatlichen Handels meist nur Muskelfleisch zur Untersuchung zur Verfügung steht und damit der histologische Nachweis nicht mehr durchführbar ist.

2.5.3. Biologische Nachweismethoden

Abgesehen von dem von MARTIN 1960 erprobten TTC-Test und dem von WRENN 1968 beschriebenen Glykogentest, die beide darauf beruhen, nach Östrogenapplikation an Ratte oder Maus biochemische Veränderungen im Bereich der Vagina aufzuzeigen, ist die zur Zeit für die Rückstandsuntersuchung auf östrogene Stoffe vielseitigste biologische Nachweismethode der Mäuseuterusgewichtstest (MUGT).

Er beruht darauf, daß nach Verabreichung östrogen-wirksamer Substanzen oder von solchem Material, das diese Stoffe enthält, bei der noch nicht geschlechtsreifen, weiblichen Maus ein Östrus provoziert wird.

Im Jahre 1923 entwickelten ALLEN und DOISY einen Test mit dem sie bewiesen, daß das Ovar Produktionsstätte des Follikelhormons ist. Sie ovariectomierten Mäuse und Ratten und injizierten ihnen subcutan Follikelflüssigkeit. Nach Versuchsende untersuchten sie das Vaginaepithel der Versuchstiere und stellten die für eine Brunst typischen verhornten Vaginaepithelien, das sog. Schollenstadium, fest.

Werden juvenile, weibliche Mäuse ovariectomiert, ist die endogene Östrogenproduktion vom Ovar dieser Tiere mit Sicherheit ausgeschaltet, so daß Östruserscheinungen am Uterus dieser Tiere dann ausschließlich auf Östrogenverabreichung deuten.

Am Uterus der Versuchstiere konnten ebenfalls Veränderungen aufgewiesen werden (FRANK 1922).

Der Uterus juveniler, weiblicher Mäuse ist klein, anämisch und undurchsichtig (ALLEN 1922, ZONDEK 1926, SNELL 1956). Durch Östrogeneinfluß vergrößert sich der Uterus der juvenilen Maus und nimmt an Gewicht zu. Er wird hyperämisch und transparent. Die Oberflächenepithelien zeigen Hypertrophie und Hyperplasie, die Uterindrüsen sind ebenfalls hypertrophiert und sezernieren. Das Stroma zeichnet sich durch ein interstitielles Ödem aus. Histologisch ist auch eine Vergrößerung der Muskelzellen im Stratum mukuläre festzustellen (NITSCHKE u. FABIAN 1970).

Die Erkenntnisse von ALLEN und DOISY liegen auch dem von

UMBERGER, GASS und CURTIS 1958 entwickelten Mäuseuterustest zugrunde, der auf Arbeiten von STOB, ANDREWS und ZARROW 1954 basiert.

Nach oraler Verabreichung östrogenhaltiger Substanzen für die Dauer von sieben Tagen werden die juvenilen, weiblichen, nicht ovariektomierten Versuchsmäuse (n.o. Mäuse) am 8. Tag getötet und deren Uterus gewogen.

Weisen die Meßwerte der Uteri der Versuchstiere zu den Uterusmessungen an den Kontrolltieren erhöhte Werte auf, ist das Ergebnis als positiv zu betrachten; d.h. östrogene Aktivität war in der verfütterten Substanz vorhanden. In einem gewissen Applikationsbereich (12-60 ng/Maus/4 Tage) steht die Östrogenzufuhr in Korrelation zum Uterusgewicht der Mäuse.

In Anlehnung an den Mäuseuterustest von UMBERGER et al. 1958 wurde diese Nachweismethode speziell für Rückstandsuntersuchungen auf östrogene Stoffe von mehreren Autoren modifiziert.

TIECCO 1961/1968 verwendete weibliche, juvenile Ratten im Alter von 20 bis 22 Tagen bei einer Versuchsdauer von drei Tagen. Weitere Modifikationen des Testes und der Untersuchung auf Praktikabilität in der Routine liegen vor (THIEL u. SCHAAL 1962, SCHAAL 1963, ZUNDEL u. RINJARD 1964, berufend auf Arbeiten von ASTWOOD 1938, SCHAAL u. KLEIKAMP 1967, KARG 1969, SCHAARSCHMIDT 1969, KARG, SCHAARSCHMIDT u. WALDSCHMIDT 1970).

Dabei ergab sich, daß eine Abkürzung des Versuches auf fünf Tage (SCHAARSCHMIDT 1969) und sogar auf drei Tage (KARG 1971) durchaus für Praxisverhältnisse geeignet ist, ohne die Aussagekraft zu beeinträchtigen (GROßKLAUS 1972).

Die von KARG 1970 und THIEL 1971 vorgeschlagene Untersuchung wurde nun für die Routineuntersuchung eingesetzt. Dabei ergab sich, daß dieser Test speziell bei Kalbfleischproben Störfaktoren auslöste. Sie manifestierten sich darin, daß auch die Uterusgewichte der Kontrollgruppen erhöhte Werte gleich denen der Testgruppe zeigten, teilweise noch über den Gewichten der Testgruppe lagen.

Schon 1969 wurde von VOGT et al. und 1970 von VOGT und KARG auf die uterotrope Wirkung ernährungsphysiologischer Imbalancen und insbesondere verschiedener Fettarten hingewiesen. Auch GODGLÜCK und SIEWERT 1971, HÖPKE 1971, SIEWERT 1971 und KLEIN 1972 wiesen aufgrund ihrer Versuchsergebnisse bei Kalbfleischfütterung an juvenile, weibliche Mäuse auf oben erwähnte Störfaktoren in den Kontrollgruppen hin und zweifelten daher die Praxisreife des derzeitigen Mäuseuterustestes an.

VOGT et al. 1969 schloß solche Störreaktionen, wie sie auch bei Verfütterung von Vollmilchpulver auftraten, aus, indem er ovariectomierte Mäuse (o. Mäuse) verwendete. SIEWERT 1971 berichtete über erste Versuche mit ovariectomierten Mäusen, deren Einsatz für die Untersuchung von Östrogen wirkenden Stoffen in Kalbfleisch er für aussichtsreicher hielt.

In gleichem Sinne haben sich aufgrund orientierender eigener Versuche MANTEL 1972 und HÖPKE 1972 geäußert.

3. E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Versuchsplanung

Der Mäuseuterusgewichtstest nach UMBERGER, GASS und CURTIS 1958 wurde als biologische Nachweismethode für östrogen wirkende Stoffe in Kot und Fleischproben an Hand eigener Untersuchungen erprobt.

Es sollte zunächst mit handelsüblichem Mäusefutter und verschiedenen, definierten DÄS-Zusätzen die Abhängigkeit unterschiedlicher Hormonmengen auf das Mäuseuterusgewicht aufgezeigt werden.

Sodann waren Untersuchungen mit Kälberkot und Kalbfleisch geplant, bei denen neben Kontrollgruppen auch Proben mit verschiedenen, definierten DÄS-Mengen angesetzt wurden. Mit Kot-, Fleisch- und Organproben wurden unter Verwendung juveniler (n.o. Mäuse) und ovariectomierter, juveniler Mäuse (o. Mäuse) Parallelversuche angesetzt.

Abschließend war die Frage zu klären, für welches Probenmaterial im biologischen Nachweis auf östrogen-wirksame Stoffe juvenile Mäuse verwandt werden können, und für welche Untersuchungsmaterialien es nötig ist, ovariectomierte Mäuse einzusetzen.

3.1.2. Versuchstiere (n.o. und o. Mäuse)

Juvenile, nicht ovariectomierte Mäuse (n.o. Mäuse)

Juvenile, weibliche Mäuse aus einer homogenen Zucht (eigenes verwendetes Tiermaterial vom NMRI-Stamm; Bezugsquelle: Zentrale Versuchstieranlage, Bundesgesundheitsamt Berlin) können im Alter von 18 bis 21 Tagen und einem Gewicht von 10 g $\pm$ 1,5 g in den Versuch eingesetzt werden (GODGLÜCK u. SIEWERT 1971).

Die Gewichtsbestimmung der Tiere diente dazu, um einerseits bei zu leichten Tieren keine Ausfälle während des Versuches

zu verzeichnen und durch das maximale Gewicht von 11,5 g einen zweiten Meßwert zur Altersbestimmung zu haben. Eine exakte Altersbestimmung der Tiere war unerlässlich, da bei älteren Mäusen die endogene Östrogenproduktion schon begonnen haben konnte.

Bis zum Versuchsbeginn bekamen die Tiere handelsübliches Mäusefutter der Firma "Altromin" und Wasser ad libitum. Als Einstreu in die Makrolonkäfige wurden Sägespäne verwendet.

Die Temperatur im Tierstall war auf ca. 20°C eingestellt.

Ovariectomierte, juvenile Mäuse (o. Mäuse)

Weibliche Tiere des gleichen Stammes und gleicher Haltung wurden im Alter von 18 - 21 Tagen und einem Gewicht von 10 g $\pm$ 1,5 g ovariectomiert.

Material und Reagentien:

Diäthyläther pro narkosi, peroxydfrei

Äthanol 70 %

Sulfonamidpuder (z.B. Marfanil-Prontalbin)

Chirurgisches Instrumentarium:

Skalpell; feine Schere; feine, gebogene Augenpinzette;

Michelklammern 7,5 oder 12 mm; Klammerpinzette

Technik der Ovariectomie (nach VOGT):

Die Tiere wurden in einem durchsichtigen Behältnis, z.B. in einem Becherglas, in dem sich ein Äthergetränkter Zellstofftupfer befand, narkotisiert.

Um die Narkosetiefe besser regulieren zu können, hat es sich bewährt, den direkten Kontakt des Tieres mit dem Äthertupfer zu vermeiden und eine perforierte Aluminiumfolie auf den Tupfer zu legen.

Das so narkotisierte Tier wird mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand auf einer Unterlage fixiert und der Rücken mit Alkohol angefeuchtet, um eine Verunreinigung des Operationsfeldes durch Haare zu verringern. Danach wird im Bereich der Nierengegend ein Hautschnitt von ca. 1 cm Länge in der Rückenlinie angelegt (s. Abb. 1).

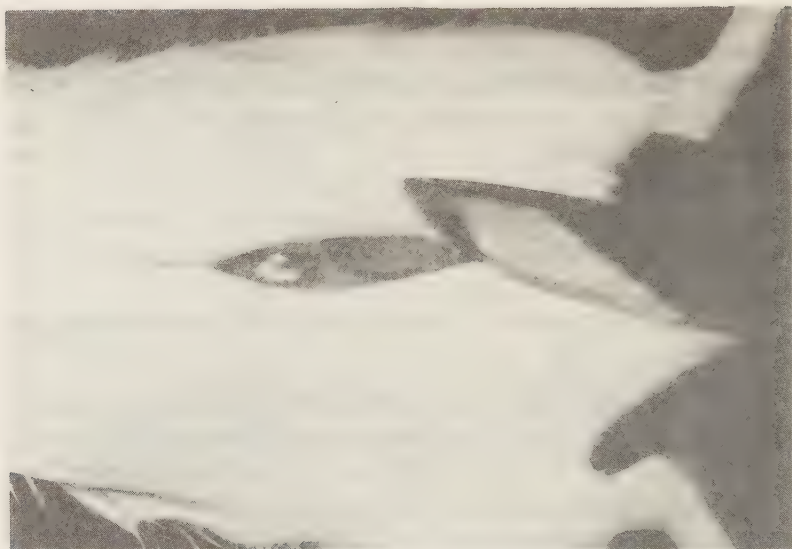


Abb. 1 Anlegung des Hautschnittes in der Rückenlinie

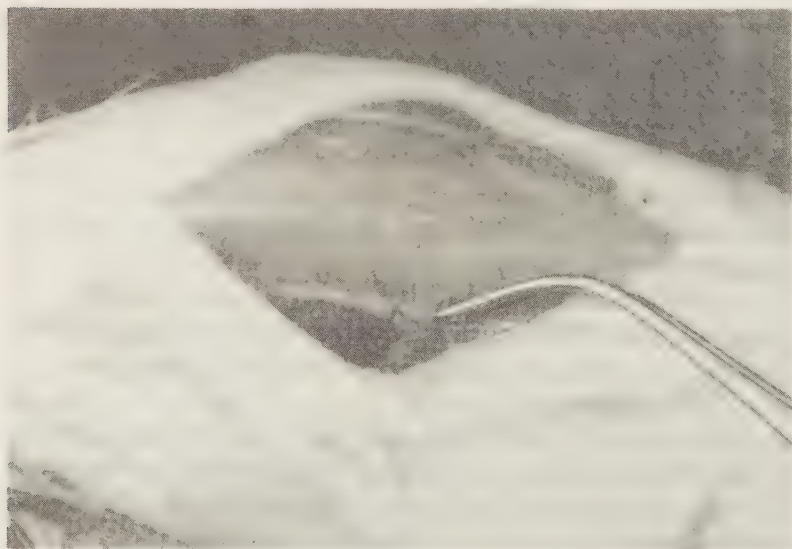


Abb. 2 Ovar, unter den Fascien der Bauchmuskulatur
deutlich erkennbar

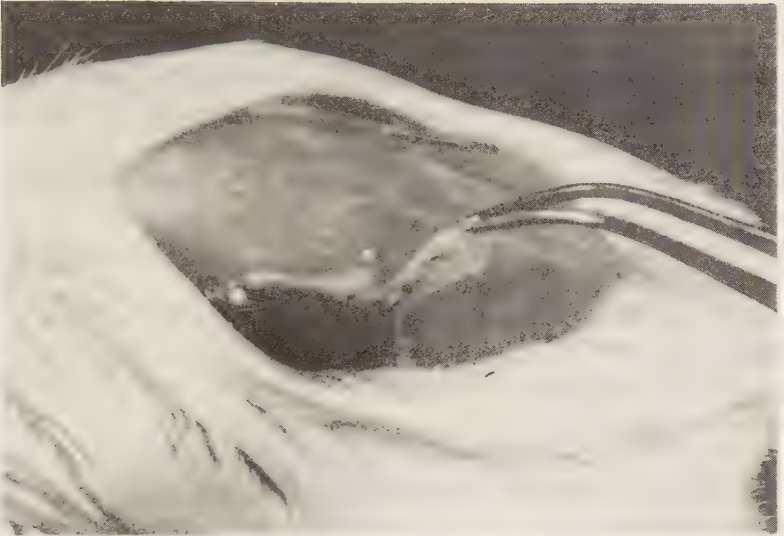


Abb. 3 Aus der Einstichstelle vorgelagertes Ovar
mit einem Teil des Uterushornes

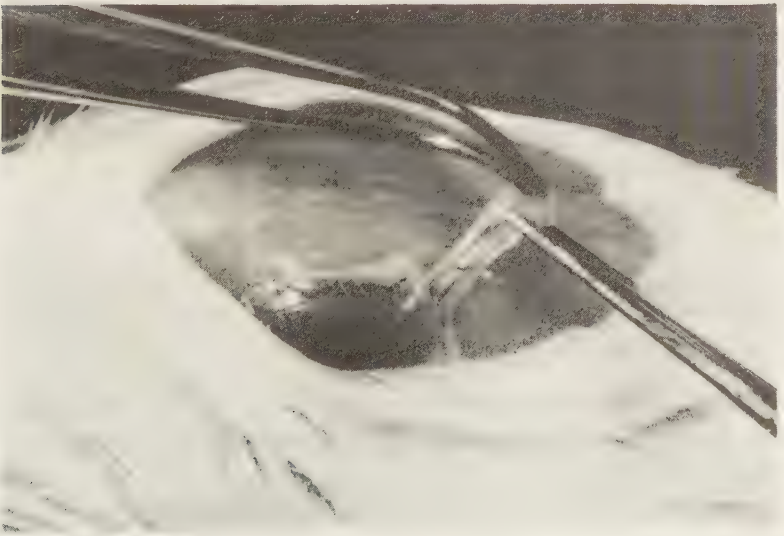


Abb. 4 Abtrennen des Ovars vom Uterus

Durch seitliches Verschieben des Felles wird etwa 0,5 cm paramedian der Wirbelsäule durch die Hautöffnung das hirsekorngroße, weißlich-gelbe Ovar unter den Fascien der Bauchmuskeln sichtbar. Je nach Ernährungszustand des Tieres ist es mehr oder weniger von Fett umgeben.

Mit einer feinen, gebogenen Pinzette, die zunächst geschlossen zu halten ist, wird die Bauchmuskulatur kaudal des Ovars durchstoßen und der Eierstock mit der Pinzette erfaßt (s. Abb. 2).

Der so fixierte Eierstock wird mit einem Teil des Uterushornes aus der Einstichstelle vorgelagert (s. Abb. 3) und mit einem Scherenschlag kranial vom Uterushorn durchtrennt (s. Abb. 4).

Das Uterushorn wird reponiert und das gegenüberliegende Ovar nach Verschieben des Hautschnittes auf gleiche Weise extirpiert.

Die Hautwunde wird mit einem Sulfonamidpuder versorgt und anschließend geklammert.

Kleinere Blutungen, die nach dem Abtrennen des Ovars gelegentlich auftreten, kommen in der Regel zum Stillstand und erfordern keine Versorgung.

Auch sind nach eigenen Erfahrungen besondere aseptische Maßnahmen nicht erforderlich.

Das Operationsinstrumentarium ist jedoch stets mit Alkohol zu desinfizieren.

3.1.3. Untersuchte Materialien

Grundfutter

Versuchsproben

Zu handelsüblichem Mäusefutter in Mehl- und Pelletform wurden Zusätze von definierten Östrogenmengen in Diäthylätherlösung gegeben.

Diese Lösung wurde durch Verdünnung einer äthanolischen Diäthylstilböstrol-Lösung von 1 mg DÄS/ml hergestellt.

Der letzte Verdünnungsschritt wird mit Diäthyläther vorgenommen, damit bei Mischung dieser Lösung unter das Grundfutter, ein vollständiges und schnelles Abdampfen des

Lösungsmittels Äther gewährleistet ist.

Auch alleinige Zusätze von Lösungsmitteln wie Äther und Alkohol wurden unter das Mäusefutter gemischt und nach vollständigem Abdampfen verfüttert.

Kontrollproben

Den Kontrolltieren wurde handelsübliches Mäusefutter in Mehl- oder Pelletform verabreicht.

Kot

Versuchsproben

Frischer oder tiefgefroren gelagerter Kot wurde folgendem Extraktionsverfahren unterzogen (nach KARG):

Mindestens 20 g Kot wurde eine Menge von 160 ml Äthanol/Äther im Verhältnis 1 : 3 zugesetzt und mit einem geeigneten Gerät homogenisiert (Ultra-Turax).

Anschließend wurde dieses Gemisch 20 min. bei ca. 3000 U/min. zentrifugiert (STOCK-Zentrifuge).

Der Überstand wurde abgegossen und der Bodensatz nochmals mit 60 ml Äthanol/Äther im Verhältnis 1 : 3 vermischt und wie oben angegeben zentrifugiert.

Nach Abgießen des Überstandes wurde der Bodensatz ein drittes Mal mit 60 ml Äthanol/Äther (1 : 3) vermischt und erneut abzentrifugiert.

Die drei Überstände wurden vereinigt und der Äther im Rotationsverdampfer abgedampft.

Der Rückstand von ca. 1 ml wurde nun mit 45 g des kommerziellen Mäusefutters vermischt und der Testgruppe verabreicht.

Kontrollproben

Die Kontrollgruppe erhielt ein entsprechendes Grundfutter, dem östrogenfreier, nach dem gleichen Extraktionsverfahren aufbereiteter Kot zugefügt worden war.

Positivkontrolle

Sollten Eichkurven zur quantitativen Bestimmung östrogener

Aktivität aufgezeichnet werden, so waren östrogenfreiem Kot vor der Extraktion verschieden hohe DÄS-Zusätze beizufügen und dann einem gleichen Extraktionsverfahren, wie oben beschrieben, zu unterziehen.

Fleisch

Versuchsproben

Mindestens 96 g der Fleisch- oder Organprobe (frisch oder bei -18°C tiefgefroren und zur Verarbeitung aufgetaut) wurde mit einem Mikrofleischwolf zerkleinert und mit eiweißarmem, östrogenfreiem Grundfutter folgender Zusammensetzung vermengt:

55% Weizenschrot

43% Maisschrot

2% Vitamin-Mineralstoffmischung

Das Verhältnis Fleisch zu Grundfutter betrug 2 : 1.

Dieses Gemisch wurde in Tagesrationen zu je 24 g aufgeteilt und bis zur Verfütterung bei -18°C tiefgefroren.

Kontrollproben

Es waren mindestens 96 g einer östrogenfreien Fleisch- oder Organprobe nötig. Bei der Verarbeitung der Kontrollprobe wurde wie bei der Versuchsprobe vorgegangen.

Positivkontrolle

Zur Herstellung der Positivkontrolle wurde die östrogenfreie Fleisch- oder Organprobe mit dem eiweißarmen Grundfutter, dem Zusätze von definierten DÄS-Mengen in Diäthylätherlösung beigegeben waren, verknetet.

Somit war die Aufstellung von DÄS-Standardkurven möglich.

3.1.4. Versuchsanordnung

Die nach Gewichtsklassen von $10 \text{ g} \pm 1,5 \text{ g}$ klassifizierten Versuchstiere wurden randomisiert und in vierer Gruppen pro Makrolonkäfig verbracht.

Zur Untersuchung einer Probe waren mindestens acht Tiere nötig. Wurden die Körpergewichte vor Versuchsbeginn notiert,

war ein Vergleich mit den Gewichten zu Versuchsende möglich, der Rückschlüsse auf eventuelle Erkrankungen und den Futterverzehr der Tiere während des Versuches zuließ.

Bei einer Versuchsdauer von drei Tagen (SCHAARSCHMIDT 1969, KARG 1971) erhielt jeder Käfig mit vier Versuchsmäusen pro Tag eine Ration von 24 g des Fleisch-Grundfuttergemisches. Bei der Verfütterung von Tiermehl oder gemahlenen Pellets wurden zu Versuchsbeginn für die Dauer von drei Tagen 45 g Tiermehl bzw. gemahlene Pellets oder 45 g Kot-Grundfuttergemisch in die Käfige gestellt.

Die Futtergefäße mußten aus einem Material bestehen, das eine absolute Östrogendekontamination gestattete. Es eigneten sich dazu Kunststoffgefäße zum Einmal-Gebrauch oder Glas- bzw. Metallgefäße, wenn ein mehrmaliger Gebrauch erwünscht war. Wasser stand den Versuchstieren jeweils ad libitum zur Verfügung.

3. .5. Auswertung

Tötung

Nach 3-tägiger Fütterung wurden die Tiere am vierten Tag, also 24 Stunden nach der letzten Fütterung, mit Chloroform getötet und ihr Endgewicht festgestellt.

Sektion

Die Tiere wurden in Rückenlage an den Extremitäten mit Präpariernadeln fixiert und das Fell der Bauchregion mit Wasser angefeuchtet, um das Sektionsfeld von Haaren frei zu halten.

Die Bauchhöhle wurde durch einen Schnitt in der Linea alba eröffnet, zwei seitliche Schnitte entlang der Leistenegend gestatteten ein Zurückklappen der Bauchdecken.

Nachdem das Darmkonvolut nach kranial vorverlagert war, wurde der Uterus sichtbar. Mit einem Scherenschlag wurde er so von der Cervix abgetrennt, daß beide Uterushörner im Verbund blieben.

Mit einer Pinzette wurden die Uterushörner angehoben, von Fett und Bindegewebe befreit und bei nicht operierten Tieren

kurz vor dem Ovar, bei ovariectomierten Tieren von der ver-narbten Exstirpationswunde abgetrennt.

Wägung

Um Gewichtsverluste zu vermeiden, wurde der herausgelöste Uterus sofort nach der Präparation auf einer Analysenwaage mit Hilfe eines Aluminiumblättchens gewogen. Eine Entfer-nung intrauteriner Flüssigkeit war bei sofortiger Wägung nicht erforderlich.

Soll die Auswertung nicht anschließend an die Sektion ge-schehen, kann die Wägung des Uterus bei entsprechender Fixierung (z.B. Bouinsche Lösung) auch später erfolgen. Intrauterine Flüssigkeit wird bei diesem Verfahren vor der Wägung entfernt.

Statistische Auswertung

Nach Errechnung des prozentualen Verhältnisses von Ute-rusgewicht (mg) zum Endkörpergewicht (g) der pro Probe angesetzten acht Mäuse wurden diese Werte mit denen der Kontrollgruppe verglichen.

Die Signifikanz der Abweichung dieser Werte wurde mit Hil-fe des Wilcoxon-Rangtestes ermittelt (GEIGY: Wissenschaftl. Tabellen 1968).

Eine im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikante Er-höhung der Uterusgewichte im Verhältnis zum Körperge-wicht spricht für ein Vorhandensein östrogen-wirksamer Substanzen.

3.2. Ergebnisse und Besprechung

Die in den Tabellen zusammengefaßten Werte sind jeweils Mittelwerte von vier Mäusen pro Versuchsgruppe, sofern nicht ein besonderer Vermerk angefügt ist, um die Käfig-unterschiede ersichtlich zu machen.

Die genannten Körpergewichte (g) geben die Gewichte der Tiere zu Versuchsende, kurz vor der Tötung an. Uterusge-wichte sind sofort nach der Sektion auf einer Analysen-waage ermittelt worden und in Milligramm angegeben.

Unter der Angabe "% Uterus-: Körpergewicht" sind jeweils

die Uterusgewichte in Bezug zum Endkörpergewicht gesetzt worden.

Die Versuchsdauer betrug jeweils drei Tage, d.h. die Sektion erfolgte am vierten Tag. Als Vorfütterung wurde allen Tieren Pellets (Fa. Altromin) angeboten.

3.2.1. Grundfutter

Tabelle 1 stellt die Werte einander gegenüber, die bei der Fütterung von 45 g gemahlenden Pellets und gleicher Menge Tiermehl als Grundfutter an 21 Tage alte, juvenile Mäuse ermittelt worden sind. Es ist keine unterschiedliche Reaktion der Uteri nach Gaben von gemahlenden Pellets oder Tiermehl ersichtlich.

In Tabelle 2 sind die Werte dargestellt, die sich bei Zugabe von je 20 ml der Lösungsmittel Äther und Alkohol zu 45 g gemahlenden Pellets bzw. Tiermehl ergaben.

Ein Vergleich der ermittelten absoluten und relativen Uterusgewichte in Tabelle 1 und 2 läßt keine signifikanten Unterschiede erkennen. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte eine uterotrope Wirkung von Äther und absol. Alkohol, unter Grundfutter gemischt und anschließend abgedampft, an der juvenilen Maus (n.o. Maus) nicht beobachtet werden.

Tabelle 3 enthält die Werte, die sich bei der Verwendung von ovariectomierten, 21 Tage alten Mäusen ergaben.

Die operierten Tiere wurden drei Tage post operationem (p.op.) in den Versuch eingesetzt und erhielten als Grundfutter gemahlene Pellets.

Ein Vergleich mit den Werten der n.o. Tiere in Tabelle 1 ergibt sowohl hinsichtlich der absoluten Uterusgewichte (UG) als auch der Prozentwerte UG : KG, daß sich bei Verwendung von o. Tieren alle Werte auf einem niedrigeren Niveau bewegen und die Einzelwerte weniger streuen.

Die Reaktion der Uteri bei Zugabe unterschiedlicher DÄS-Mengen zu gleichem Grundfutter ist aus Tabellen 4 und 5 ersichtlich. Sowohl bei 21 Tage alten n.o. Mäusen (Tab. 4) als auch bei o. Mäusen gleichen Alters (Versuchseinsatz drei Tage p.op./Tab. 5) bewirken Gaben von DÄS eine signi-

fikante Uterusgewichtserhöhung , wie der Vergleich mit den Kontrollwerten in Tabelle 1 und 3 zeigt.

Bei o. Tieren ist schon bei einer Gabe von 100 ng DÄS zum Grundfutter ein statistisch gesicherter Nachweis möglich ($P \leq 0,01$).

In höheren DÄS-Konzentrationen zeigen sowohl o. als auch n.o. Mäuse signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollwerten (Tab. 1 und 3).

Jedoch ist aus Tabelle 4 zu entnehmen, daß bei allen angebotenen DÄS-Konzentrationen sehr große Streuungen innerhalb der einzelnen Mittelwerte des absoluten und relativen Uterusgewichtes (UG/UG : KG) auftreten. Die statistische Absicherung ergab, daß bei n.o. Mäusen kein signifikanter Unterschied zwischen 250 und 500 ng bzw. 500 und 750 ng vorliegt, während dies bei o. Mäusen der Fall ist. Dies trifft allerdings nicht zwischen der 500 ng und der 1000 ng DÄS-Gruppe zu.

3.2.2. Kot; Inhalt verschiedener Darmabschnitte; Gallenflüssigkeit

Für die Kotuntersuchung wurde sowohl der Kot institutseigener Kälber (BGA Berlin) als auch Kot von Schlachtkälbern unbekannter Herkunft des Schlachthofes Berlin verwendet.

In den Ergebnistabellen ist darauf hingewiesen, ob Kot weiblicher oder männlicher Tiere vorlag. Sind keine Hinweise auf die untersuchte Kotmenge gegeben, so wurde jeweils 20 g Kot dem Extraktionsverfahren unterzogen.

Bei allen Untersuchungen wurde der Kotextrakt unter 45 g Grundfutter gemischt.

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Ergebnisse, die ermittelt wurden, nachdem 21 Tage alte, n.o. Mäuse den Extrakt aus 20 g bzw. 40 g Kot zum Grundfutter erhalten hatten. Die Uterusgewichte und die Prozentwerte liegen auf einem höheren Niveau als bei alleiniger Gabe von Grundfutter. Hinsichtlich der Geschlechtsspezifität sind bei der Verabreichung von Extrakt aus 20 g Kot keine Unterschiede ersichtlich. Bei der Gabe von Extrakt aus 40 g Kot ist

in zwei Versuchsgruppen eine drei- bis fünffache Uterusgewichtserhöhung gegenüber den übrigen Werten festzustellen. In beiden Fällen stammte der Kot von einem weiblichen Kalb.

Parallelversuche mit n.o. und o. Tieren bei einer Gabe von 20 g Kot zeigt Tabelle 7.

Der hier verwendete Kot wurde von einem männlichen, institutseigenen Kalb entnommen, das gleichzeitig als Kontrollkalb für DÄS-Rückstandsuntersuchungen im Fleisch verwendet wurde (KO-Kalb). Bei der Betrachtung der Mittelwerte ergibt sich, daß die Uterusgewichte der o. Tiere niedriger liegen und geringer variieren als bei n.o. Tieren.

Wie aus Tabelle 8 zu ersehen ist, wurden hier verschiedene DÄS-Konzentrationen unter 20 g bzw. 40 g Kot gemischt.

Jede dieser Konzentrationen hat im Vergleich mit den Kontrollwerten in Tabelle 6 und 7 zu einer Gewichtserhöhung geführt, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% gesichert ist. Bei 250 ng und 750 ng DÄS scheinen die Einzel- und Mittelwerte konzentrationsabhängig.

Unterschiedliche Ergebnisse aufgrund der Kotmenge und des Geschlechtes sind nicht erkennbar.

Größere Streuungen weisen dagegen die Werte bei 500 ng DÄS auf. Die Einzelwerte sind hier im Extrem um den Faktor 6 voneinander verschieden. Unterschiede aufgrund des Geschlechtes der Kälber sind auch hier nicht eindeutig erkennbar. Jedoch liegen bei der Konzentration von 500 ng DÄS und der Gabe von 40 g Kot männlicher Kälber die Mittelwerte auf niedrigerem Gruppenniveau.

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse zusammengestellt, die bei der Untersuchung vom Kot des männlichen, institutseigenen Testkalbes (TK-Kalb) erhalten worden sind; es wurden 50 mg DÄS i.m. gespritzt.

Die erste Kotentnahme erfolgte kurz vor der Injektion, die weiteren Proben wurden täglich zur gleichen Zeit entnommen und geben Anhaltspunkte für den Ausscheidungsverlauf der injizierten DÄS-Menge im Kot.

Es wurden Parallelversuche mit n.o. und o. Mäusen angesetzt. Maximalwerte wurden am 1. Tag post injectionem (p.i./n.o.

Mäuse) sowie am 2. Tag p.i. (o. Mäuse) verzeichnet. An den darauf folgenden Tagen sinken die Werte, um am 5. Tag p.i. bei den o. Tieren den Ausgangswert vor der Injektion erreicht zu haben. Bei den n.o. Tieren liegen die Werte am 5. Tag p.i. noch nicht ganz auf dem Anfangsniveau.

Nach der graphischen Darstellung (Fig. 1) bleibt der Ausscheidungsverlauf beim Einsatz n.o. und o. Mäuse der gleiche. Nur beginnen und enden beide Kurven auf einem unterschiedlichen Niveau und erscheinen dementsprechend in ihrem gesamten Verlauf gegeneinander versetzt.

Nach der Schlachtung sind Inhalt von Duodenum, Colon und Psalter sowohl vom Testkalb als auch vom Kontrollkalb entnommen und untersucht worden. Die Ergebnisse der Paralleluntersuchungen mit n.o. und o. Tieren sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Daraus wird ersichtlich, daß in keinem der untersuchten Darmabschnitt-Inhalte signifikante Unterschiede, weder bei der Verwendung von n.o. noch o. Mäusen, zu den Kontrollwerten bestehen.

Zur Untersuchung der Gallenflüssigkeit des Testkalbes und des Kontrollkalbes wurde ein Gallenanteil von 0,35%, bezogen auf die Gesamtfuttermenge, unter das Grundfutter gemischt (Tab. 11). Zum Versuchseinsatz kamen o. Mäuse. Mit Hilfe des Wilcoxon-Rangtestes konnten die Gruppenunterschiede an Hand von je acht Einzelwerten nicht statistisch gesichert werden; daraus könnte auf kein Vorhandensein von DÄS in der Gallenflüssigkeit geschlossen werden.

3.2.3. Organe: Leber, Niere

Als Organproben wurden vom Testkalb und Kontrollkalb Leber und Niere entnommen und bis zur Verarbeitung bei -18°C gelagert. Bei der Verarbeitung wurde in gleicher Weise wie bei den Fleischproben verfahren.

Zur Untersuchung der Leber wurden sowohl n.o. als auch o. Mäuse eingesetzt. Die vorliegenden Ergebnisse in Tabelle 12

zeigen keine signifikante Erhöhung der Werte in den Versuchsproben zu den Kontrollwerten an, die auf DÄS-Rückstände schließen lassen.

Die Werte, die in Tabelle 13 dargestellt sind und bei der Untersuchung der Niere vom Testkalb und Kontrollkalb ermittelt wurden, stellen Einzel- und keine Gruppen-Mittelwerte dar. Aufgrund des geringen Probenmaterials konnten weitere Untersuchungen nicht mehr erfolgen. Wie aus Tabelle 13 zu ersehen ist, läßt sich eine statistisch gesicherte Erhöhung der Einzelwerte der Versuchsproben gegenüber den Kontrollproben nachweisen. Sowohl bei n.o. Mäusen als auch bei o. Mäusen konnte das Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% gesichert werden.

3.2.4. Fleisch

Tabelle 14 soll eine Übersicht über die Versuche geben, in denen Kontroll-Kalbfleischproben sowohl an 21 Tage alte n.o. Mäuse als auch an o. Mäuse gleichen Alters (Versuchseinsatz drei Tage p.op.) verfüttert wurde.

Ein Vergleich der Mittelwerte der absoluten und relativen Uterusgewichte zeigt, daß der Uterus von n.o. Tieren mit sehr unterschiedlichen Gewichtserhöhungen reagiert. Die Werte weisen eine erhebliche Streuung auf. Bei der Errechnung der Summe der Mittelwerte ergibt sich, daß die Uterusgewichte, absolut, und die prozentualen Werte von UG : KG bei n.o. Tieren fast dreimal so hoch sind wie die der o. Tiere. Bei diesen liegen die Werte auf einem niedrigeren Niveau und haben geringere Streuung.

Die gleichen Fütterungsversuche (Kontrollkalbfleisch) wurden mit Mäusen durchgeführt, denen im Alter von 18 bzw. 19 Tagen die Ovarien entfernt worden waren. Das Alter zum Zeitpunkt der Operation ließ dabei keinen Einfluß auf das Ergebnis im Vergleich zu den am 21. Lebenstag operierten Mäusen erkennen.

Aus Tabelle 15 soll die uterotrope Wirkung verschiedener DÄS-Zusätze zum Kontrollfleisch bei der n.o. Maus ersicht-

lich werden. Dabei zeigen die Uterusgewichte keine Dosisabhängigkeit an.

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse bei gleicher Fragestellung und Einsatz von o. Mäusen im Alter von 21 Tagen dargestellt. Die hohe Anzahl der durchgeführten Versuche im 0,01 ppm DÄS-Konzentrationsbereich sollte die Frage klären, ob der signifikante Unterschied zur Kontrolle in diesem Bereich einheitlich gewahrt bleibt. Die erhaltenen Ergebnisse lassen diesen Schluß zu.

Als Dosiswirkungskurve sind Parallelversuche graphisch dargestellt, in denen n.o. und o. Mäuse gleichzeitig definierte DÄS-Konzentrationen unter Kontrollfleisch vermischt verabreicht erhielten (Fig. 2).

Die hier veranschaulichten Ergebnisse sind unter Berücksichtigung der Tabellen 15 und 16 zu betrachten. Wie auch dort so zeigte sich, daß bei der n.o. Maus in keinem Dosisbereich signifikante Unterschiede im Vergleich mit den Kontrollwerten bestanden. Bei den o. Tieren besteht dagegen eine deutliche Korrelation zwischen DÄS-Konzentration im Futter und den ermittelten Uterusgewichten.

Es sollte ferner die Frage geklärt werden, ob und in welchem Maße der Einsatz von o. Mäusen mit zunehmendem Zeitabstand vom Operationsdatum einen Einfluß auf die Ergebnisse zur Folge hat. Dies ist in Figur 3 veranschaulicht.

Es wurden jeweils Parallelversuche mit Kontrollgruppen und der Konzentration 0,01 ppm DÄS im Fleisch angesetzt. In einigen Fällen, wenn genügend Tiermaterial vorhanden war, wurde zusätzlich 0,005 ppm DÄS im Fleisch verabreicht. Diese Versuche ergaben unabhängig von dem zeitlichen Einsatz der Mäuse p.op. immer signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrollgruppe. Bei der Konzentration 0,005 ppm DÄS im Fleisch war in einem Fall bei Tieren, die am 2. Tag p.op. eingesetzt worden waren, keine statistische Absicherung möglich.

Es ist anzumerken, daß bei Tieren, die vom 4. Tag an und darüber hinaus p.op. verwendet wurden, eine zunehmende

Fetteinlagerung in der Bauchhöhle bei der Sektion die Präparation des Uterus erschwerte. Dieser Umstand machte sich um so störender bemerkbar, je später die Tiere nach der Operation zum Versuch eingesetzt wurden. Der Zeitaufwand für die Sektion konnte sich dabei verdoppeln bis verdreifachen.

Als erste, einfache Orientierung sollen die Untersuchungsergebnisse des Versuches gelten, der in Tabelle 17 dargestellt ist. Das hier verwendete Kalbfleisch stammt von dem männlichen KO-Kalb und dem männlichen TK-Kalb, dem 50 mg DÄS in die Glutäenmuskulatur i.m. injiziert worden war. Die Schlachtung der ca. 4,5 Monate alten Bullkälber erfolgte am 6. Tag p.i.

Nach der Schlachtung wurde versucht, möglichst genau die Injektionsstelle vom Testkalb zu entnehmen. Dies bereitete allerdings wegen der Entfernung der Einstichstelle vom Injektionsdepot Schwierigkeiten und konnte nicht mehr genau lokalisiert werden.

Eine weitere Probe wurde in einem Abstand von ca. 20-25 cm von der vermuteten Injektionsstelle entnommen ("weitere Injektionsstelle"). Auch wurden Proben der Glutäenmuskulatur aus der nicht infizierten Extremität und von der Schultermuskulatur des Testkalbes entnommen.

Als Kontrollfleisch galt entnommene Glutäenmuskulatur des Kontrollkalbes.

Die Ergebnisse in Tabelle 17 zeigen, daß bei der Verwendung von o. Mäusen in den Proben aus der engen Injektionsstelle nicht immer, sondern in nur vier der untersuchten Fleischproben signifikante Unterschiede zur Kontrolle möglich waren. Auch weisen die Mittelwerte der jeweils ersten vier Versuche im Vergleich zu den folgenden Werten die nahezu vier- bis fünffache Höhe auf.

Extrem hohe Werte sind auch bei den Fleischproben aus dem "weiteren Injektionsbereich" in den ersten Untersuchungen dieser Art festgestellt worden. Alle übrigen Mittelwerte besaßen zu den Kontrollwerten signifikante Unterschiede. Eine statistische Absicherung gegenüber der Kontrolle war

auch in fünf Versuchen möglich, in denen Fleisch aus dem nicht infizierten Hinterschenkel des Testkalbes zur Verwendung kam.

In der Schultermuskulatur des Testkalbes konnte aufgrund der vorliegenden Ergebnisse in keiner der untersuchten Proben auf das Vorhandensein östrogenen Aktivität geschlossen werden.

Wurden n.o. Mäuse in den Versuch eingesetzt, so sind, wie aus Tabelle 17 ersichtlich, nur zweimal bei der Verfütterung von Fleisch aus der "weiteren Injektionsstelle" uterotrope Substanzen statistisch gesichert nachgewiesen worden. Die geringe Menge des Fleischmaterials aus der Injektionsstelle erlaubte keine weiteren Versuche mit n.o. Mäusen.

Tabelle 2 (Pelletfütterung; o. Tiere)

Ø	KG (g)	KC - Pellets	
		UG (mg)	% (UG:KG)
15,9	6,9	3,14	45
14,1	6,2	2,71	19
14,1	7,2	4,95	69
13,8	6,9	5,59	80
12,4	8,2	6,16	74
13,8	7,7	6,56	85
11,9	9,1	6,03	66
14,0	8,2	5,93	72
14,0	9,9	4,93	49
10,9	5,9	3,93	66
10,1	11,2	6,60	59
11,0	11,6	5,22	45
10,6	11,3	6,61	61
11,3	9,9	6,11	61
9,8	13,8	4,57	33
13,0	11,5	3,47	30
13,8	12,0	5,24	43
12,8	12,1	5,53	46
7,8	17,8	3,6	20
Ø		6,8	0,055

labelle 5 (Zugabe verschied. DÄS-Konz. zum Grundfutter; o. Tiere)

50 mg DÄS			100 mg DÄS			200 mg DÄS			1000 mg DÄS		
KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)	KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)	KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)	KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)
14,2	7,7	0,054	14,8	19,7	0,133	11,7	21,8	0,186	11,9	51,7	0,441
15,4	10,6	68	17,2	34,2	198	9,2	18,4	0,200	11,8	54,0	457
15,2	9,0	59	13,9	14,8	106	9,8	21,6	220	12,1	56,0	462
14,0	9,7	69	16,2	17,8	109	8,9	19,7	221	9,4	49,5	526
		$\overline{\text{Ø } 0,062}$			$\overline{\text{Ø } 0,136}$			$\overline{\text{Ø } 0,216}$			$\overline{\text{Ø } 0,433}$
					**			**			**
					14,0			14,0			12,1
					10,3			10,3			11,2
					10,0			10,0			11,2
					11,2			11,2			12,1
					50,0			50,0			49,5
					50,0			50,0			51,8
					446			446			442
					$\overline{\text{Ø } 0,442}$			$\overline{\text{Ø } 0,442}$			$\overline{\text{Ø } 0,442}$

** $P \leq 0,01$ zur Kontrolle

Zugabe v. Kotextrakt zum Grundfutter; n.o. Tiere

Tabelle 6

ø KG (g)	<u>20 g Kot</u>		ø	KG (g)	<u>40 g Kot</u>		% (UG:KG)
	UG (mg)	% (UG:KG)			UG (mg)	% (UG:KG)	
10,3	12,5	0,119 (w/S.)		14,0	18,1	0,127 (m/I)	
10,7	8,3	76 "		13,7	14,8	108 "	
10,4	7,0	66 "		14,5	12,4	85 "	
11,4	9,7	82 "		8,9	9,1	102 "	
10,3	8,8	82 "		7,9	7,9	98 "	
12,4	12,8	103 (w/I.)		7,8	5,9	73 (w/I)	
12,1	11,1	91 "		7,0	7,4	95 "	
12,3	12,9	108 "		8,8	56,7	646 "	
12,2	13,3	109 "		14,1	103,7	728 "	
8,3	12,8	156 "		12,5	10,8	86 "	
13,6	13,8	101 "					
10,4	9,1	0,086 (m/S.)					
12,2	10,2	83 "					
9,9	6,7	66 "					
13,9	11,5	82 (m/I.)					
13,5	11,2	83 "					
8,8	10,8	124 "					
7,4	8,3	101 "					
11,4	15,7	142 "					
14,3	19,0	133 "					
9,0	7,9	89 "					
8,8	9,1	102 "					

w = Kot weiblicher Tiere
m = Kot männlicher Tiere
S = Schlachtkälber; Schlachthof
I = Institutskälber

Table 1
Results of the experiment

Ø	KG (g)	<u>n.o. Tiere</u>		Ø	KG (g)	Ø	<u>n.o. Tiere</u>		(g)
		UG (mm)	% (UG:KG)				UG (mm)	% (UG:KG)	
	9,6	8,1	0,084		11,8		11,8	0,070	
	10,2	8,3	0,081		11,8		11,8	0,070	
	10,2	9,6	0,094		11,8		11,8	0,070	
	10,1	8,9	0,088		11,8		11,8	0,070	
	11,8	11,7	0,099		11,8		11,8	0,070	
	11,8	10,9	0,092		11,8		11,8	0,070	
		Ø 9,7	Ø 0,090				Ø 11,8	Ø 0,063	

*** P < 0,01 zur Kontrolle

Kotuntersuchung vom männlichen TK

Ausscheidungsverlauf von 50 mg DÄS, i.m. injiziert

Tabelle 9

Ø	KG (g)	<u>n.o. Tiere</u>		Tage p.i.	Ø	KG (g)	<u>o. Tiere</u>	
		UG (mg)	% (UG:KG)				UG (mg)	% (UG:KG)
10,1	7,5	0,074		-		11,7	7,7	0,065
9,0	66,9	0,643		1.		11,6	45,7	0,401
10,3	61,4	0,597		2.		11,5	54,8	0,480
12,2	19,7	0,162		3.		11,6	15,2	0,132
12,7	14,3	0,115		4.		10,7	7,5	0,069
11,8	15,8	0,132		5.		11,1	6,9	0,062

Untersuchung einzelner Darmabschnitte (Inhalt) vom KO-Kalb und TK;
 Parallelversuche mit n.o. und o. Tieren
 Tabelle 10

<u>20 g Duodenuminhalt</u>				<u>20 g Psalterinhalt</u>				<u>20 g Coloninhalt</u>			
Ø	KG	UG	(g)	Ø	KG	UG	(g)	Ø	KG	UG	(g)
			(UG:KG)				(UG:KG)				(UG:KG)
KO				KO				KO			
9,6	8,8		0,089 (n.o.)	9,7	8,2		0,084 (n.o.)	9,7	7,3		0,078 (n.o.)
8,2	8,0		99 (o.)	8,5	7,7		89 (o.)	9,5	7,5		75 (o.)
DÄS				DÄS				DÄS			
10,2	12,1		0,120 (n.o.)	10,9	13,5		0,121 (n.o.)	12,4	12,2		0,097 (n.o.)
10,9	10,4		95 (o.)	13,0	9,9		76 (o.)	11,3	8,5		75 (o.)
n.s.				n.s.				n.s.			

n.s. = nicht signifikant zur Kontrolle

Untersuchung von Gallenflüssigkeit

Gallenanteil berechnet auf Gesamtfuttermenge betragt 0,35

o. Tiere

Tabelle 11

Ø	KO - Galle			Ø	DXS - Galle		
	KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)		KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)
9,9	4,7	0,048		10,8	6,2	0,059	
10,8	6,1	56		10,9	6,9	63	
11,6	6,6	57		10,3	6,8	66	
10,2	6,1	57		12,2	8,1	67	
11,0	6,8	64		11,7	7,2	63	
11,1	6,6	64		11,4	8,5	75	
Ø 10,7	Ø 6,2	Ø 0,058		Ø 11,2	Ø 7,3	Ø 0,066	

Paralleluntersuchung der Leber vom Testkalb und Kontrollkalb

Tabelle 12

Ø	KG (g)	$\frac{K.O.}{UG}$ (mg)		%	(UG:KG)	Ø	KG (g)	$\frac{D.A.S.}{UG}$ (mg)		%	(UG:KG)
		UG	UG					UG	UG		
12,9	6,5	0,050					13,3	6,1		0,050	
13,5	6,7	0,050					13,2	7,9		60	
13,5	8,0	58					12,7	8,5		66	
13,9	7,6	57	0.	0.			13,9	9,1		66	
10,5	6,3	60					12,9	6,9		57	
11,5	6,9	62					10,9	8,1		61	
10,9	12,8	0,124	N.O.	N.O.			10,2	11,9		0,115	
9,8	13,1	133					11,2	13,0		0,115	

Alle Werte nicht signifikant zur Kontrolle

Untersuchung von der Miere des Fortkalbe- und Kontrollkalbe-

Tabelle 13

N.O. - Tiere			O. - Tiere			N.O. - Tiere			O. - Tiere		
KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)	KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)	KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)	KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)
7,1	8,6	0,121	12,8	5,1	0,039	12,2	26,7	0,202	17,0	29,8	0,175
8,8	11,4	0,129	19,8	9,7	0,049	11,5	25,9	0,225	13,2	27,3	0,207
11,2	12,8	0,114	10,8	5,3	0,049	9,0	17,5	0,194	12,2	22,6	0,185
10,3	9,6	0,093	14,8	7,6	0,051	10,0	19,6	0,196	14,0	23,9	0,171
7,1	6,3	0,089	16,0	6,9	0,057	13,0	28,4	0,218	13,8	30,2	0,219
10,0	11,0	0,110	12,2	5,6	0,046	10,9	24,8	0,228	13,2	30,5	0,231
7,1	7,3	0,103	10,5	5,5	0,052	12,2	21,1	0,173	12,1	28,2	0,237
6,8	8,2	0,121	14,3	5,1	0,036	13,1	26,4	0,201	11,9	26,3	0,221
Ø 8,6	Ø 9,4	Ø 0,110	Ø 13,9	Ø 6,4	Ø 0,048	Ø 11,6	Ø 23,8	Ø 0,205	Ø 13,4	Ø 24,4	Ø 0,205

Aufgeführte Werte sind Einzelwerte

** P < 0,01 zur Kontrolle

Tabelle 14 (KO-Kalbfl.fütterung; li.: n.o./re.: o. Tiere)

Ø	KG (g)	Ø	UG (mg)	Ø	%(UG:KG)	Ø	KG (g)	Ø	UG (mg)	Ø	%(UG:KG)	Alter z.Zt.der OP.
12,0	10,8	0,089	9,9	5,1	0,051							
12,1	12,2	103	9,9	6,7	67							
10,5	9,0	86	11,6	7,3	63							
11,6	12,7	109	11,3	7,0	63							
10,5	28,0	267	11,9	5,4	46							
10,2	27,0	251	13,1	6,9	53							
12,1	14,9	116	11,6	7,3	64							
11,7	31,3	265	11,1	6,4	61							
11,4	20,1	177	10,6	8,7	81							
11,3	25,2	225	10,9	10,3	96							
13,6	56,9	408	12,5	7,2	59							
12,1	39,9	333	12,9	9,0	71							
8,0	17,5	221	11,4	6,9	62							
8,8	17,0	192	11,0	7,0	0,065							
			8,1	6,6	81							
			9,9	7,9	84							
			10,5	7,7	73							
			9,0	6,9	75							
			9,0	7,1	79							
			13,3	9,1	68							
			11,6	9,6	85							
			9,4	7,0	69							
			13,0	10,3	78							
			13,7	11,4	84							
			13,8	7,9	0,058							
			11,6	7,2	63							
			13,5	9,8	72							
			13,2	8,7	66							
			10,7	7,8	74							
			10,7	6,6	62							
			10,7	7,1	66							
			9,7	7,0	72							
			13,2	8,3	62							
			11,8	8,1	72							
			11,7	6,1	52							
			11,1	7,0	63							

Ø 0,064

Ø 0,065

Ø 0,063

Tabelle 15 (Zugabe verschied. DÄS-Konz. zum KO-Kalbfleisch; n.o. Tiere)

200 ng DÄS (0,008 ppm)				420 ng DÄS (0,016 ppm)				820 ng DÄS (0,032 ppm)				1220 ng DÄS (0,048 ppm)				
Ø	KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)	Ø	KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)	Ø	KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)	Ø	KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)	
7,3	17,5	0,245		2,2	10,4	0,112		1,2	2,6	0,112		12,2	19,4	0,152		
11,3	16,1	144		13,2	21,1	141		12,8	17,3	154		14,4	17,9	123		
9,6	17,1	181		15,2	31,5	200		14,1	21,5	212		13,2	16,2	122		
11,5	12,8	112		14,7	31,0	209		14,4	25,0	175		14,9	23,1	154		
9,7	13,2	135		14,9	26,1	176		14,1	25,8	186		12,3	27,1	218		
9,5	20,9	215		8,5	18,8	223		12,8	21,5	163		13,6	22,0	161		
11,5	13,8	117			Ø 23,5	Ø 0,183			Ø 21,7	Ø 0,162			Ø 17,7	Ø 0,152		
10,9	15,2	138														
12,8	19,3	147														
10,4	14,8	142														
14,0	17,5	123														
11,0	21,8	198														
13,9	19,2	138														
13,8	39,2	267														
13,4	37,8	263														
14,3	33,2	223														
			Ø 20,6	Ø 0,174												

Verschiedene DÄS-Zusätze zum Kalbfleisch; o. Tiere
Tabelle 16

25 ng DÄS (0,001 ppm)			125 ng DÄS (0,005 ppm)			250 ng DÄS (0,01 ppm)			1250 ng DÄS (0,05 ppm)		
Ø KG	UG	%	Ø KG	UG	%	Ø KG	UG	%	Ø KG	UG	%
(g)	(mg)	(UG:KG)	(g)	(mg)	(UG:KG)	(g)	(mg)	(UG:KG)	(g)	(mg)	(UG:KG)
11,3	9,7	0,086 n.s.	12,6	11,8	0,094**	12,2	11,3	**	12,2	32,5	0,266**
10,9	13,1	121**	11,9	10,8	88**	11,5	12,2	0,094**	11,5	34,5	304**
11,9	9,7	77**	10,4	13,7	133**	13,3	17,9	105**	9,4	34,1	368**
12,1	11,9	101	10,3	12,8	127**	17,3	17,3	135**	9,5	40,6	432**
12,1	8,7	72 n.s.	9,1	9,5	107	12,0	14,5	124**	9,8	40,3	412**
12,8	8,4	65 n.s.	13,0	9,3	72 n.s.	12,0	14,3	119**	10,2	49,4	484
Ø 10,2 Ø 0,087			11,5	8,7	76 n.s.	8,2	11,8	143**	Ø 39,0 Ø 0,377		
			Ø 10,9 Ø 0,100			9,8	12,6	129**			
						10,4	15,8	151**			
						10,5	19,3	185**			
						10,7	11,5	108**			
						10,8	11,7	108**			
						10,4	16,4	162**			
						10,3	15,2	151			
						Ø 14,2 Ø 0,134					

n.s. = nicht signifikant für Kontrolle

*P ≤ 0,05 zur Kontrolle

**P ≤ 0,01 zur Kontrolle

Fleischfütterung vom KO-Kalb u. TK; n.o. und o. Tiere

Tabelle 17

KO-Kalb				TK-enge Injekt.				TK-weitere Injekt.			
Ø	KG	UG	%	Ø	KG	UG	%	Ø	KG	UG	%
	(g)	(mg)	(UG:KG)		(g)	(mg)	(UG:KG)		(g)	(mg)	(UG:KG)
		o. Tiere				o. Tiere				o. Tiere	
12,9	55,3	0,427		14,3	61,6	0,464	n.s.	13,3	62,3	0,411	n.s.
12,9	51,2	410		14,1	67,3	476	n.s.	14,3	60,1	469	n.s.
12,3	44,7	364		11,9	54,1	454	*	13,1	56,7	432	*
12,9	49,0	385		13,3	56,5	426	*	12,6	64,6	514	*
15,0	5,9	40		16,5	13,6	83	**	11,1	15,7	141	**
11,9	5,3	45		15,2	10,0	65	**	8,5	12,5	147	**
15,3	8,5	56		15,2	12,7	83	**	12,2	16,0	131	**
14,9	7,3	49		10,4	8,5	82	n.s.	9,7	14,6	145	**
11,1	7,3	67		10,3	8,6	83	n.s.	13,2	17,6	134	**
11,6	10,2	89		9,7	9,1	93	n.s.	11,6	15,7	141	**
10,5	10,4	102		11,3	7,9	70	n.s.	14,4	18,7	140	**
11,1	10,0	92		11,9	11,1	92	n.s.	12,9	18,7	145	**
n.o. Tiere				n.o. Tiere				n.o. Tiere			
s. nächste Seite				s. nächste Seite				s. nächste Seite			
n.s. = nicht signifikant zur Kontrolle											
*P ≤ 0,05 zur Kontrolle											
**P ≤ 0,01 zur Kontrolle											
s. nächste Seite											

TK-nicht inf. Extrem.				TK-Schultermuskul.			
Ø	KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)	Ø	KG (g)	UG (mg)	% (UG:KG)
n.o.o. Tiere				o. Tiere			
KO-Kalb							
9,0	9,3		0,107		12,8	52,3	0,427 n.s.
7,5	7,8		102		13,8	47,2	343 n.s.
10,4	11,7		112		12,6	48,6	391 n.s.
10,5	14,0		134		11,5	40,6	350 n.s.
10,9	13,0		120		12,9	16,7	131**
TK-eng.Injekt.					13,2	15,7	121**
10,5	11,9		0,118 n.s.		11,8	14,2	123**
9,9	11,2		112 n.s.		15,0	13,7	87**
9,6	9,3		98 n.s.		15,4	14,9	96**
TK-weitere Injekt.					10,2	11,5	113 n.s.
9,6	14,4		0,150 n.s.		10,8	12,2	111 n.s.
9,2	11,9		131 n.s.		10,6	14,7	104 n.s.
9,4	13,9		149 n.s.		n.s. = nicht signifikant zur Kontrolle		
10,6	21,6		179**		*P ≤ 0,05 zur Kontrolle		
10,2	19,7		195**		** P ≤ 0,01 zur Kontrolle		

n.s. = nicht signifikant zur Kontrolle

* $P \leq 0,05$ zur Kontrolle** $P \leq 0,01$ zur Kontrolle

Fig.1
Ausscheidungsverlauf von D'S im Kot bis 5 Tage p.i.

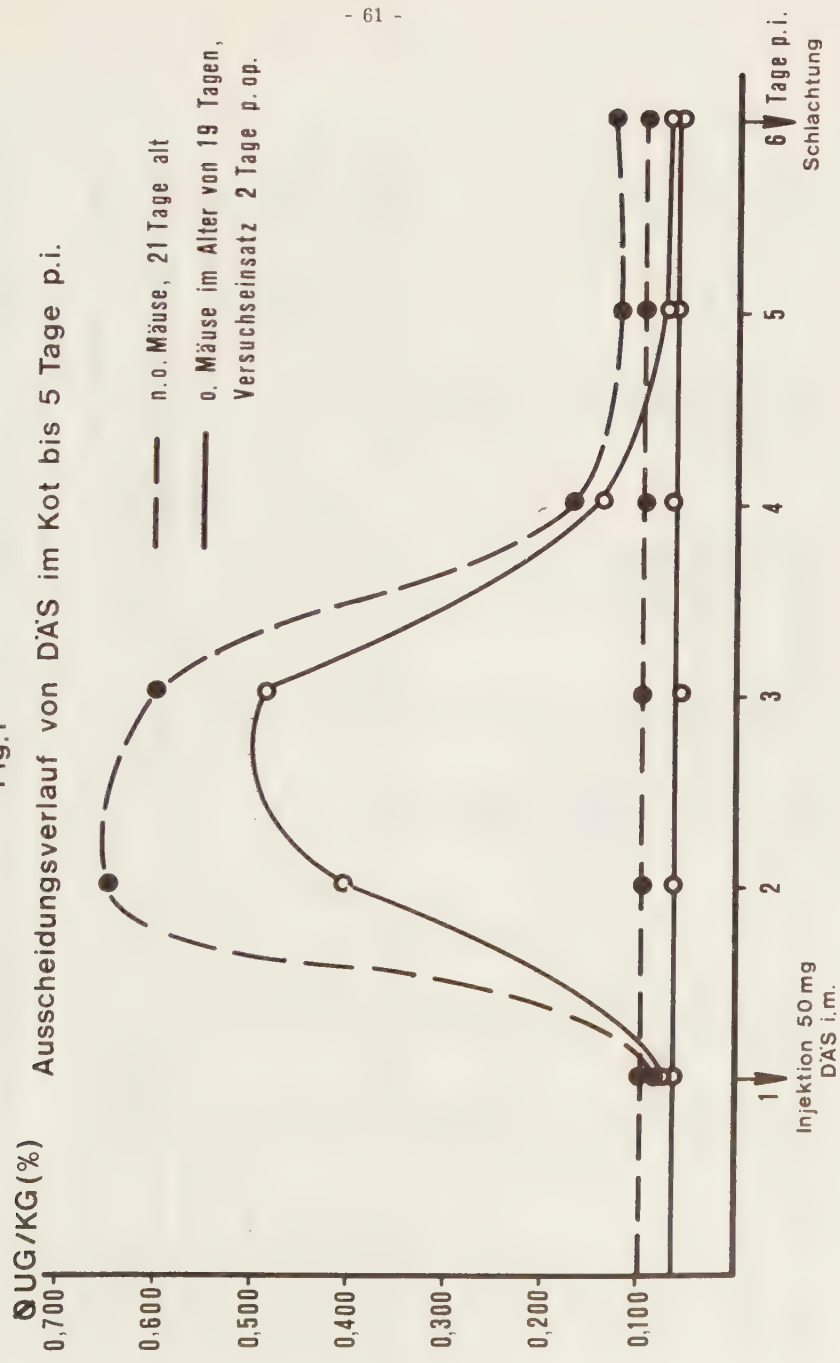


Fig. 2

Fütterung von Kalbfleisch mit versch. DÄS-Zusätzen

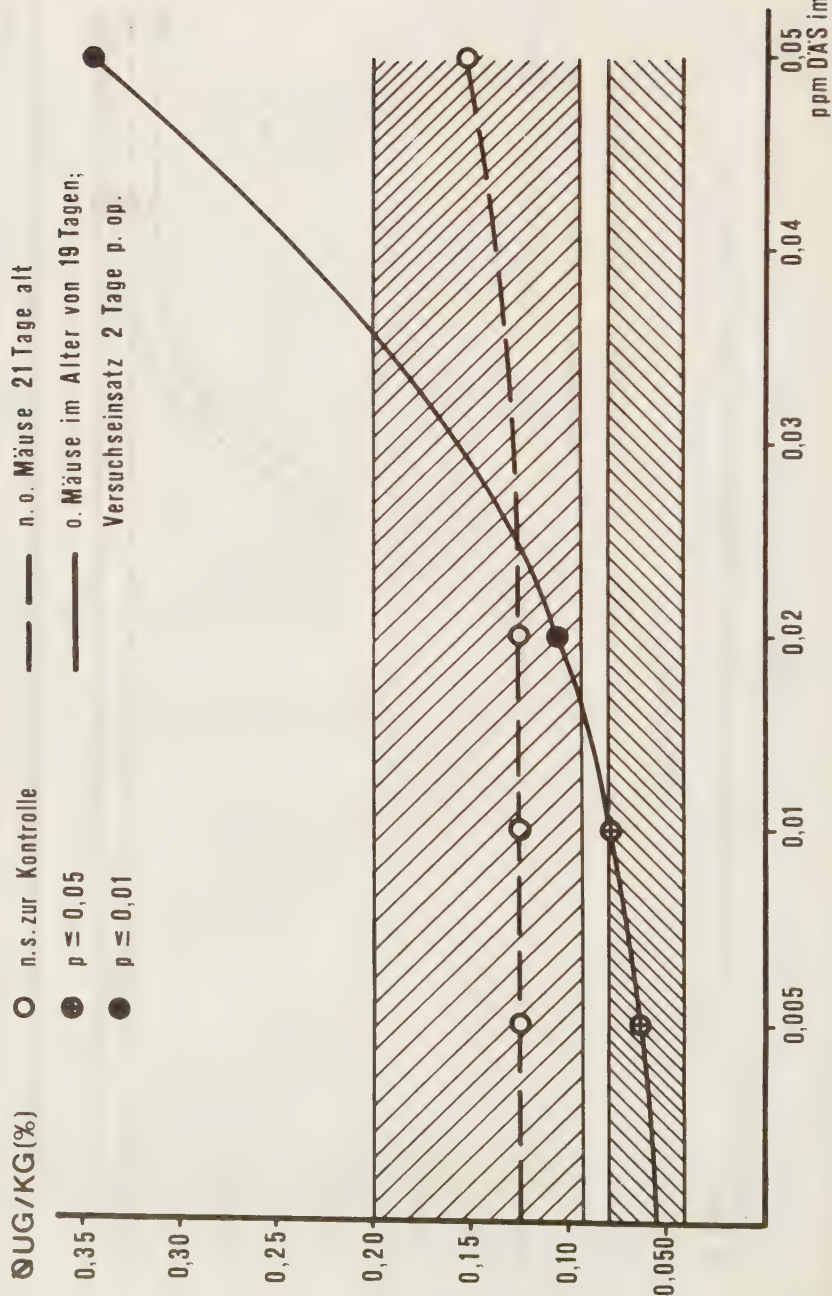
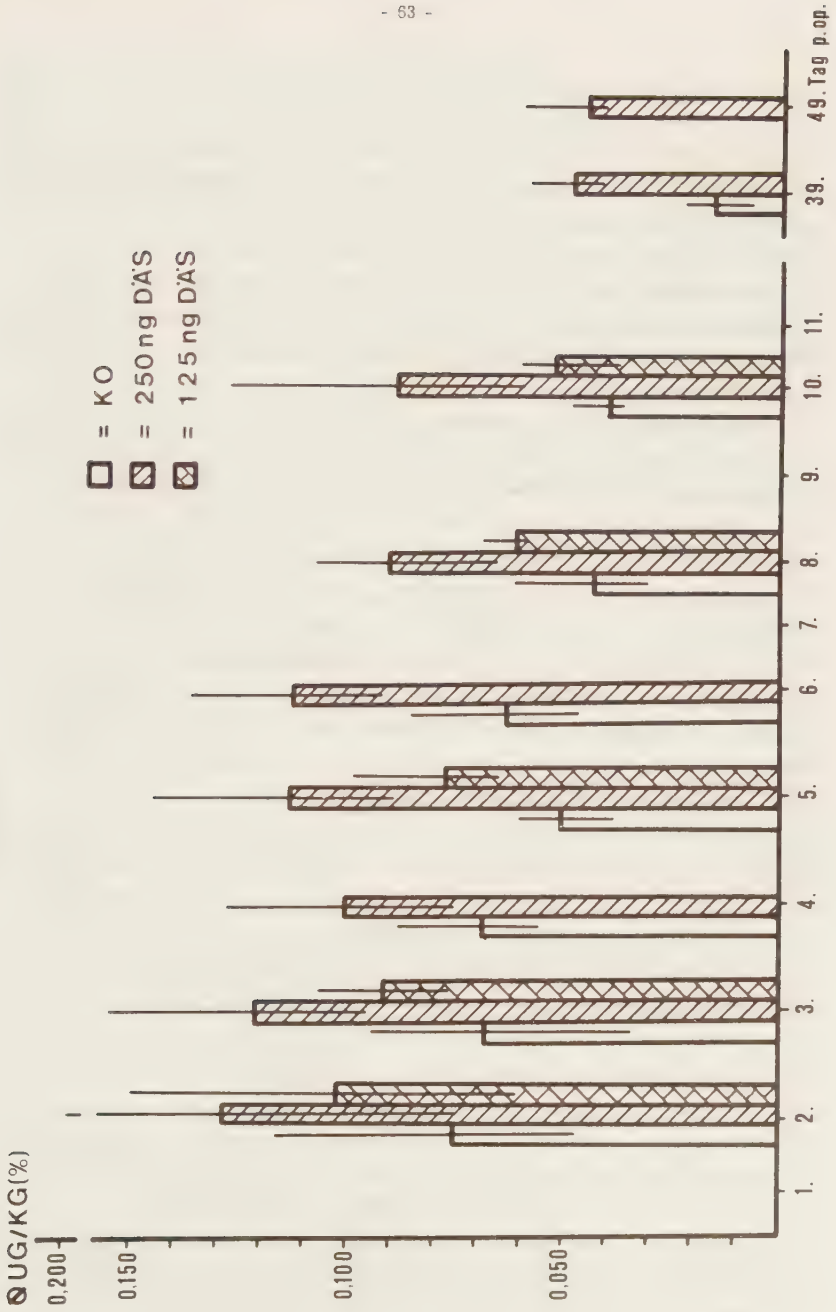


Fig.3



4. D i s k u s s i o n

Ziel dieser Arbeit war, einen methodischen Beitrag für die biologische Rückstandsuntersuchung auf östrogen wirkende Stoffe zu liefern.

Dabei ging es hauptsächlich um einen Vergleich zwischen ovariektomierten und nicht ovariektomierten Mäusen, die im Mäuseuterusgewichtstest nach UMBERGER, GASS und CURTIS 1958, modifiziert nach KARG 1970 und THIEL 1971, eingesetzt worden waren.

Störfaktoren, die in neuerer Zeit bei der Untersuchung von Kalbfleischproben (HÖPKE 1971, SIEWERT 1971) und auch in Vollmilchpulver (VOGT, KARG, GASS 1969) beim Einsatz von n.o. Mäusen auftraten, konnten von VOGT et al. 1969 bei Verwendung von o. Mäusen eliminiert werden.

Diese Autoren weisen darauf hin, daß schon WIBERG und STEPHENSON 1957 und UMBERGER und GASS 1958 durch Fütterung reinen Rinderfettes zu einer Fleischgrunddiät bei der n.o. Maus einen uterotropen Effekt provoziert haben. Sie deuten diese Erscheinung damit, daß bestimmte im Futter enthaltene Nährstoffe bei Tieren, die schon der Pubertät nahe sind, unmittelbar die Östrogenbildung provozieren.

Fälschlicherweise kann bei auf diese Art entstandenen Uterusgewichtserhöhungen der juvenilen Maus auf östrogene Aktivität in der untersuchten Probe geschlossen werden. Futterkomponenten, die in besonderem Maße für eine sexuelle Stimulierung verantwortlich gemacht werden, sind Eiweiß und Laktose; diese jedoch lösen wiederum nur in bestimmten Mengenanteilen im Futter einen uterotropen Effekt aus. Auch der Gehalt an Gesamtenergie im Futter soll von Bedeutung sein.

Extrem hohe östrogene Aktivität konnte in einer Reihe von Ölen und Fetten, besonders im Sojaöl, Leinöl und Lebertran von den Autoren beobachtet werden (VOGT u. KARG 1971). Andererseits sind diese Öle in der Lage, oral zugeführte DÄS-Zusätze bis zu einer Dosierung von 30 mcg/kg Futter völlig zu neutralisieren. Es wird daher auch von einer "antiuterotropen" Wirkung dieser Stoffe gesprochen. Durch

diese Futterkomponenten soll eine Störung der DÄS-Resorption im Darmtrakt der Versuchstiere verursacht werden. Sollte die oben erwähnte Hypothese der endogenen Hormonaktivierung durch Beschleunigung des Pubertätseintrittes zutreffen, so ist es durchaus einleuchtend, daß bei Entfernung des Produktionsorgans der Östrogene, des Ovars, das bei der Auslösung der Pubertät vom HVL ausgeschüttete follikelstimulierende Hormon (FSH) keinen peripheren Angriffsort findet. Die im Uterus vorhandenen Östrogenrezeptoren (JENSEN et al. 1971) reagieren folglich nach Ovariectomie der Tiere nur noch auf von außen zugeführtes Hormon, dessen Nachweis die Gewichtserhöhung des Uterus darstellt. Sollte also der an Hand von Ölen und Fetten geschilderte Wirkungsmechanismus mit uterotropen Effekt in den Versuchsreihen aufgrund bestimmter Futterkomponenten ausschlaggebend sein, so ist in diesem Falle die Kastration der Tiere nicht erfolgversprechend, da diese Stoffe nicht unmittelbar über den HVL oder auf das Ovar, sondern direkt auf den Uterus bzw. auf die Resorption im Verdauungstrakt einwirken (VOGT u. KARG 1971).

In den eigenen Untersuchungen wurde zunächst Grundfutter, das auch in den Kot- und Fleischuntersuchungen als Basisfutter diente, an n.o. und o. Mäuse verfüttert (Tab. 1 u. 3). Obwohl kein Futterwechsel bei Versuchsbeginn vorlag, weisen die Uteri der n.o. Tiere stärker streuende und in der Regel höhere Gewichte auf als die o. Tiere. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß unter den n.o. Mäusen einige Tiere die Altersgrenze zur Geschlechtsreife annähernd oder völlig erreicht haben und so die größeren Streuungen der Uterusgewichte auf die beginnende endogene Hormonproduktion schließen läßt. Auch ist es durchaus möglich, daß Östrogene, die von einem Tier mit Kot und Harn ausgeschieden werden, von anderen, noch nicht geschlechtsreifen Tieren im gleichen Käfig aufgenommen werden, so daß auch in diesen Tieren der Pubertätseintritt während des Versuches provoziert wird. Bei Versuchsgruppen mit relativ hohem Endgewicht lagen auch die Mittelwerte der absoluten Uterusge-

wichte auf höherem Niveau. Daraus ließe sich schließen, daß diese Tiere älter waren und auch eine größere Bereitschaft zur sexuellen Stimulierung aufwiesen, denn normalerweise besteht keine direkte Korrelation zwischen dem Körpergewicht und dem Uterusgewicht.

Sexuelle Beeinflussung der Versuchstiere untereinander kann bei den kastrierten Mäusen völlig ausgeschlossen werden und mag auch die Erklärung für die niedrigeren, in sich geschlossenere Werte in Tabelle 3 sein.

Die Lösungsmittel Äther und Alkohol (Tab. 2) wurden aus dem Grund unter das Grundfutter gemischt und nach dem Abdampfen an n.o. Mäuse verabreicht, um zu prüfen, ob diese Substanzen, die zur Herstellung der DÄS-Standardlösung zur Verwendung kommen, schon von sich aus in Verbindung mit dem Grundfutter uterotrope Wirkung zeigen.

Das Versuchsergebnis mit n. o. Mäusen verlief negativ, so daß es nicht nötig erschien, ähnliche Versuche mit o. Mäusen zu wiederholen.

Uterusgewichtserhöhungen nach Zugabe verschiedener DÄS-Konzentrationen zum Grundfutter konnten von mir bei o. und n.o. Tieren in jedem Fall gesichert ($P \leq 0,01$) ermittelt werden. Daß mit o. Mäusen der DÄS-Nachweis schon bei der niedrigen Konzentration von 100 ng gelang, ist meines Erachtens wiederum der "sexuellen Ruhigstellung" der o. Mäuse zu verdanken. Die Dosis des zugeführten DÄS steht damit innerhalb eines gewissen Bereiches in direkter Relation zur beobachteten uterotropen Wirkung. Die Empfindlichkeit des Nachweises wird durch die geringere Streuung der Werte erhöht.

Im weiblichen Organismus wird den Östrogenen teils fördernde (LH) und teils hemmende (FSH) Wirkung auf die Hypophyse zugeschrieben, was von der jeweiligen Dosierung des Hormons abhängt (KARG 1958). Auch beim Einsatz von n.o. Mäusen im Mäuseuterusgewichtstest konnte diese Tatsache bemerkt werden, da nur innerhalb eines Dosisbereiches von 12-60 ng pro Maus die Gewichtssteigerung des Uterus der Östrogenzufuhr propor-

tional war (GODGLÜCK u. SIEWERT 1971).

Unklar bleibt allerdings immer noch, warum auch bei der o. Maus nicht in allen Dosisbereichen diese Proportionalität besteht, wie es in den Versuchen mit der Dosierung von 1000 ng DÄS der Fall zu sein schien (Tab. 5).

Sofern die Ergebnisse der vorliegenden orientierenden Versuche im 1000 ng Bereich überhaupt gewertet werden sollen, mag man daran denken, daß auch beim ovariectomierten Tier eine DÄS-abhängige Uterusgewichtsteigerung nur bis zu einem gewissen Grade erfolgen kann.

Möglicherweise könnte eine "Absättigung" von Östrogenrezeptoren im Uterusgewebe der o. Maus angenommen werden.

Somit ergibt sich, daß Uterusgewichtsteigerungen im Mäuseuterusgewichtstest zwar auf ein Vorliegen östrogenener Aktivität hinweisen, quantitativ jedoch zu keiner endgültigen Aussage berechtigen. Bei der Fütterung von uterotropen Stoffen, wie z.B. von Ölen und Fetten, kann selbst von einem qualitativen Nachweis östrogenener Substanzen nicht gesprochen werden, nur vom Nachweis uterotrop-wirksamer Substanzen.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß für den qualitativen Nachweis von DÄS im Grundfutter der Aussagewert der n.o. Tiere gut ist, da in allen angebotenen Konzentrationen statistisch gesicherte Unterschiede zur Kontrolle vorlagen.

Die Verfütterung von Kotextrakten führt bei juvenilen Tieren zu einer geringen Erhöhung der Werte im Vergleich zu den Kontrollen mit reinem Grundfutter (Tab. 1/Tab. 6). Dies ist meiner Ansicht nach dadurch zu erklären, daß die Futterumstellung zum Zwecke des Versuches bei der n.o. Maus einen Einfluß auf den endokrinen Regelkreis ausübt. STOB et al. 1964 weist darauf hin, daß bei der Anwendung des Mäuseuterusgewichtstestes zur Östrogenbestimmung mit einer Diätabhängigkeit der Ergebnisse gerechnet werden muß.

Dies trifft aufgrund meiner Untersuchungen nicht für o. Mäuse zu, die bei Kotextraktverfütterung und bei Grundfuttergabe keine Unterschiede zeigten (Tab. 7).

Bei der Verfütterung von 20 g Kotextrakt traten keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich der Geschlechtsspezi-

fität der Kälber auf, jedoch liegen bei der Untersuchung von 40 g Kotextrakt zwei Werte extrem hoch, so daß sie den Ergebnissen, die bei Zugabe von 750 ng DÄS zum Kotextrakt erzielt wurden, zugeordnet werden könnten (Tab. 8).

Abgesehen davon, daß eine Kontamination dieser Proben mit DÄS während der Verarbeitung im Labor nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen ist, wäre zu diskutieren, ob nicht das weibliche Geschlecht der Kälber irgend eine Bedeutung hat. Da es sich um institutseigene Tiere handelte und die Fütteration der Tiere bekannt war, ist mit Sicherheit die Wirkung von Phytoöstrogenen auszuschließen. Da die Körpergewichte oberhalb der für Schlachtkälber geltenden Gewichtsgrenze von ca. 100 kg lagen, könnte man vermuten, daß diese beiden Kälber schon begonnen hatten, körpereigene Östrogene auszuscheiden.

Möglicherweise hatte es auch Einfluß, daß in beiden Fällen die doppelte Menge der üblichen Gabe an Kotextrakt verabreicht wurde, somit also auch darin eventuell vorhandene Östrogene in höherer Menge zugeführt wurden. Der Vergleich dieser beiden Ergebnisse mit Werten, die in Tabelle 8 bei Zusatz von 750 ng DÄS zu 20 g Kotextrakt ermittelt wurden, ist somit aufgrund der unterschiedlichen Mengen untersuchten Materials nicht gerechtfertigt.

In den Versuchen mit n.o. Mäusen, denen 250 ng und 750 ng DÄS unter den Kotextrakt gemischt worden war, lassen die Ergebnisse eine Konzentrationsabhängigkeit erkennen. Sie sind sowohl zu den Kontrollwerten (Tab. 6) als auch untereinander statistisch gesichert. Es sind keine Unterschiede zu verzeichnen, wenn Kot männlicher Kälber bzw. weiblicher Kälber oder 20 g Kotextrakt bzw. 40 g Kotextrakt verabreicht wurde.

Im 500 ng Bereich ist ebenfalls eine Sicherung der Unterschiede zu den Kontrollwerten möglich, jedoch variieren die Werte untereinander stark. Es lag nahe, die Gründe für diese unterschiedlichen Werte vornehmlich in der Probenaufbereitung zu suchen, da alle übrigen Versuchsbedingungen (Tiermaterial, Einstreu, Versuchsdauer) mit denen bei der

Gabe von 250 ng und 750 ng DÄS identisch waren. Als mutmaßliche Fehlerquelle wurde von mir vorerst ein Konzentrationsfehler beim Ansatz der DÄS-Standardlösung angenommen. Dies erwies sich bei den ersten beiden Mittelwerten, die in Tabelle 8 unter der Rubrik 20 bzw. 40 g Kot angegeben sind, als möglich, denn die in diesen Versuchen verwendete DÄS-Lösung war am gleichen Tag hergestellt worden. Die folgenden Mittelwerte, die bei der Gabe von 20 g und 40 g Kotextrakt errechnet wurden (Tab. 8), machen es allerdings eher wahrscheinlich, daß vielleicht das Geschlecht der Kälber, deren Kot in diesem Fall zur Untersuchung vorlag, einen Einfluß hat. Es waren weibliche Tiere, deren Alter jedoch nicht bekannt war. Möglicherweise hat es sich um Tiere mit schon in Gang gekommener endogener Östrogenproduktion gehandelt.

Weiterhin ist aufgrund der Versuchsergebnisse ein Mischfehler bei der Herstellung der Rationen in Betracht zu ziehen.

Bei den Kotuntersuchungen konnte, wie aus den Ergebnissen ersichtlich ist (Tab. 7,8,9; Fig. 1), in jedem Fall der qualitative Nachweis von DÄS, bei der Verabreichung an n.o. Mäuse, erbracht werden.

Auch erste orientierende Versuche, in denen der Ausscheidungsverlauf von DÄS im Kot eines Testkalbes untersucht wurde, dem 50 mg DÄS i.m. appliziert worden waren, zeigten keine unterschiedlichen Ergebnisse bei der Verwendung von n.o. und o. Mäusen (Tab. 9). Die beobachtete "Niveauverschiebung" bei der Verwendung von o. und n.o. Mäusen kann die gleichen Ursachen haben, wie sie bei der Gegenüberstellung der Kontrollwerte in Tabelle 7 diskutiert worden sind.

Die Angaben über den Ausscheidungsverlauf (Fig. 1) stimmen zum Teil mit den Ergebnissen von SCHAARSCHMIDT 1969 überein. Die Autorin ermittelte am 1. und 2. Tag p.i. einen sprunghaften Anstieg der DÄS-Ausscheidung im Kot, die bis zur Schlachtung 16 Tage p.i. steigende Tendenz zeigte.

Auch in meinen Untersuchungen stieg die DÄS-Ausscheidung am 1. und 2. Tag p.i. steil an, jedoch näherten sich die Werte der Uterusgewichte am 6. Tag p.i. bereits den Kontrollwerten.

Zur Erklärung dieses Unterschiedes in den Ergebnissen sei vermerkt, daß in den vorliegenden Versuchen DÄS injiziert wurde, während in der zitierten Literaturangabe eine "DÄSP"-Injektion angegeben wird. Daraus dürfte auf die Verabreichung von Diäthylstilböstrol-Dipropionat zu schließen sein, einem synthetischen, veresterten, phenolischen Östrogen mit maximaler Wirkungsverlängerung (EULER 1968).

Die Untersuchungen der Inhalte verschiedener Darmabschnitte, der Gallenflüssigkeit, der Leber und der Niere des Testkalbes und des Kontrollkalbes sollen nur als orientierende Versuche erwähnt sein und dürfen keinesfalls verallgemeinert werden.

Daß in keinem der Darmabschnitte (Tab. 10) des Testkalbes östrogene Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte, mußte erwartet werden, nachdem im Rektum des mit DÄS infizierten Kalbes zum Zeitpunkt der Schlachtung der DÄS-Nachweis negativ ausgefallen war.

Aufgrund der geringen Menge an Gallenflüssigkeit, die vom Test- und Kontrollkalb zur Verfügung stand, waren insgesamt nur jeweils drei Versuchsansätze mit acht o. Mäusen möglich. Die durchschnittlichen Mittelwerte der Versuchsgruppen des Testkalbes waren gegenüber den Kontrollwerten etwas erhöht, jedoch ließ sich mit Hilfe des Wilcoxon-Rangtestes bei der Gegenüberstellung der einzelnen acht Test- und Kontrollwerte keine statistische Sicherung der Gruppenunterschiede errechnen. In diesem Fall wurde ausnahmsweise an Hand einer Gegenüberstellung der jeweiligen 24 Einzelwerte des relativen Uterusgewichtes mittels des Wilcoxon-Rangtestes eine Rangziffernverteilung vorgenommen. Dies war gestattet, da alle Versuche mit Gallenflüssigkeit unter absolut vergleichbaren Versuchsvoraussetzungen durchgeführt worden waren. Das Ergebnis dieser zweiten Berechnung aufgrund der 24 Einzelwerte erbrachte eine Absicherung der Untersuchungsergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %.

Bei der Injektion von 50 mg DÄS i.m. wird also noch sechs Tage p.i. mit DÄS-Rückständen in der Galle zu rechnen sein.

Von SCHAARSCHMIDT 1969 konnten 44 Tage nach der Injektion von 20 bzw. 40 mg DÄSP keine Rückstände in der Galle mehr nachgewiesen werden.

Die Rückstandsuntersuchungen auf DÄS in der Leber des Testkalbes verliefen negativ. Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden von THIEL und SCHAAAL 1962 und SCHAARSCHMIDT 1969 überein.

Von einem Nachweis von DÄS-Rückständen in der Niere berichtet auch RUITENBERG 1967, während die Untersuchungen dieses Organs von THIEL und SCHAAAL 1962 und SCHAARSCHMIDT 1969 negativ verliefen.

Bei der Untersuchung der Organproben erbrachte die Anwendung von o. Mäusen keinen Vorteil gegenüber n.o. Tieren. Abgesehen davon, daß allein der Diätwechsel vom Grundfutter zur Versuchsfütterung bei juvenilen Tieren einen leichten uterotropen Effekt hervorrief, waren jedoch immer signifikante Unterschiede gegenüber den Kontrollwerten zu verzeichnen.

Bei der Untersuchung von Kalbfleischproben im Mäuseuterusgewichtstest erwies sich bei VOGT und KARG 1971 der prozentuale Anteil des Fleisches in der Gesamtdiät als entscheidender Faktor. So wurde z.B. bei einem Kalbfleischanteil von 15% eine uterotrope Wirkung festgestellt, während sehr hohe Anteile von 80-100% einen antiuterotropen Effekt aufwiesen (absolute Uterusgewichte von 3,5 mg). Auch deuten die Autoren auf die uterotrope Wirkung des Grundfutters hin, sofern nicht eine besondere Auswahl der Eiweißkomponenten (Fischmehl, Dorschmehl, Fischpreßsaft) getroffen wird.

In meinen Versuchen wurde ein Fleischanteil von 33% gewählt, der sich nach SCHAARSCHMIDT 1969 und VOGT et al. 1971 als brauchbar erwiesen hatte. Auch das eiweißarme Grundfutter wurde verwendet.

Dennoch übte die Kalbfleischfütterung an 21 Tage alte, n.o. Mäuse einen auffallend hohen uterotropen Effekt aus.

Lagen die Werte bei Kotgaben an n.o. Tiere etwa um ein

Drittel höher im Vergleich zu den o. Mäusen, so steigerten sich bei Kalbfleischgaben die Werte der n.o. Mäuse um den Faktor 3. Wenn also Futterumstellung ohnehin schon zu einer geringen uterotropen Wirkung führt, so scheint Kalbfleisch dies noch besonders zu begünstigen. Ob der Gehalt an Eiweiß die ausschlaggebende Komponente ist, um im juvenilen Organismus eine sexuelle Stimulierung auszulösen, ist nicht geklärt.

Bei o. Tieren dagegen sind die Mittelwerte bei Fleischgaben mit denen bei reiner Grundfuttergabe vergleichbar. Die Versuchsergebnisse beim Einsatz von Mäusen, die im Alter von 18, 19 und 21 Tagen kastriert wurden, sind von gleicher Aussagekraft. Werden Mäuse, die älter als 21 Tage sind, kastriert, so ist damit zu rechnen, daß bei diesen Tieren die Geschlechtsreife schon eingetreten gewesen war. Dies kann dann von praktischer Bedeutung sein, wenn der Einsatz in den Versuch wenige Tage nach der Kastration dieser Tiere erfolgt. Eventuell noch vorhandene körpereigene Östrogenmengen könnten dann einen ungünstigen, uterotropen Nebeneffekt herbeiführen, der das Untersuchungsergebnis verfälscht.

Wurde dem Kontrollfleisch DÄS zugesetzt und an n.o. Mäuse verfüttert (Tab. 15), so bestand keine Dosisabhängigkeit der Uterusgewichte, und es lagen keine erhöhten Werte im Vergleich zur Kontrolle vor. Diese Ergebnisse lagen immer vor. Als Fehlerquelle schalten somit wohl eine falsch angesetzte DÄS-Standardlösung sowie eine Kontamination des Kontrollkalbfleisches durch unachtsamen Umgang mit dem DÄS-Pulver aus.

Diese Untersuchungsergebnisse bei Kalbfleischproben mit n.o. Mäusen stimmen mit Aussagen von HÖPKE 1971, SIEWERT 1971 und KLEIN 1972 überein.

VOGT und KARG 1971 berichteten von einer uterotropen Wirkung bei Ölen und Fettzusätzen zur Diät, die jedoch bei gleichzeitigen DÄS-Zusätzen in eine "antiuterotrope" Wirkung umgewandelt wird.

Aufgrund der Tatsache, daß bei Verwendung kastrierter Mäuse (Tab. 16) deutliche Dosisabhängigkeit der Uterusgewichte

auftrat und schon im niedrigen 0,005 ppm DÄS-Bereich, sowie in allen höheren Konzentrationen ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle vorlag, ließe sich bei der n.o. Maus eine der von Olen bzw. Fetten ähnliche uterotrope Wirkung des Kalbfleisches ableiten.

Dies wird noch durch die Tatsache gestützt, daß auch VOGT und KARG 1971 die Störfaktoren bei Fetten und Ölen eliminieren konnten, wenn sie kastrierte Mäuse verwendeten. Sollte im übrigen kein arbeitstechnischer Fehler oder eine Kontamination vorgelegen haben, so ist zusammenzufassen, daß mit der n.o. Maus bei Kalbfleischproben weder eine qualitative noch eine quantitative Aussage über östrogen aktive Rückstände zu machen war.

Der Einsatz von o. Mäusen ermöglichte einen sicheren Nachweis vom 0,02 ppm DÄS-Konzentrationsbereich an (Fig. 2).

Für die Routineuntersuchung erscheint es bei Verwendung von o. Mäusen interessant, ob und bis zu welcher Zeit p.op. eine gewisse "Vorratshaltung" kastrierter Tiere möglich ist.

Meine Versuche (Fig. 3) deuten darauf hin, daß die Ergebnisse selbst dann noch verwertbar sind, wenn der Zeitpunkt der Operation 1,5 Monate zurückliegt.

Aus Figur 3 könnte geschlossen werden, daß der Aussagewert mit größerem Zeitabstand vom Operationsdatum sogar noch zunimmt.

Hier ergeben sich aber praktische Hindernisse.

Wurden Tiere mehr als 4-5 Tage p.op. in den Versuch eingesetzt, so erwies sich die Verfettung der Bauchhöhle als erheblicher Störfaktor während der Sektion.

Mit noch größerem Abstand vom Operationsdatum dauerte die Präparation des Uterus fast dreimal so lange wie bei frisch operierten Tieren.

Bei den o. Mäusen, die in meinen Versuchen frühestens am 2. Tag p.op. eingesetzt wurden, konnten keine Entzündungsprozesse aufgrund des operativen Eingriffes festgestellt werden. Die Uterushörner waren reaktionslos mit der Bauchwand verklebt. Das Allgemeinbefinden der frisch operierten Tiere war gut, so daß auf keinen Operationsstress der Tiere

zu schließen war.

Wenn also der tägliche Verbrauch an o. Tieren hoch ist, bietet es sich an, Mäuse zwischen dem 2. und 5. Tag p.op. in den Versuch einzusetzen und damit eine gewisse Vorrats-haltung zu betreiben.

Auf jeden Fall ist es aber nötig, Tiere vom gleichen Operationstage zu verwenden, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Die mit DÄS-Zusätzen zu östrogenfreiem Kalbfleisch erzielten experimentellen Untersuchungsergebnisse über die Verwendungsmöglichkeit n.o. und o. Mäuse wurden an einem mit 50 mg DÄS i.m. (ölige Lösung) injizierten Testkalb überprüft.

Die Ergebnisse können nur als Orientierung für weitere Versuche gewertet werden (Tab. 17).

Als erste Schwierigkeit solcher Versuche erwies es sich, die auf dem Fell markierte Injektionsstelle nach dem Abhäuten zu lokalisieren, denn eine optische Veränderung der Muskulatur war durch die Injektion nicht zu beobachten.

Alle Werte der ersten Untersuchung dieses Fleisches, inklusive der Kontrollwerte, ausgenommen die Werte der Schultermuskulatur liegen im Vergleich zu den Mittelwerten der wiederholten Versuche bis um den Faktor 5 höher.

Dabei ist anzumerken, daß der Versuchsansatz dieser ersten jeweils 16 pro Probe eingesetzten o. Tiere am gleichen Tag, unter gleichen Versuchsbedingungen, erfolgte. Die Untersuchung der Schultermuskulatur des Testkalbes wurde zu einem späteren Zeitpunkt ausgeführt.

Ein Operationsfehler, z.B. daß Reste des Ovars nicht entfernt wurden, ist unwahrscheinlich, da dieser Fehler bei allen 64 Mäusen aufgetreten ist. Es liegt nun die Vermutung nahe, daß ein methodischer Fehler vorgelegen hat, zumal bei der Zubereitung der Versuchsproben für alle weiteren Untersuchungen dieses Fleisches peinlichste Sicherheitsmaßnahmen eine eventuelle Kontamination mit Hormonsubstanzen verhindern sollten. Dazu gehörte gründliches Auswaschen aller Gefäße und Arbeitsgeräte mit Brennspiritus, isolierte Zubereitung der Kontrollproben von den

Versuchsproben und Verwendung fabrikneuer Futternäpfe aus Glas, die täglich gewechselt wurden. Es ist anzunehmen, daß allein diese Vorkehrungen dazu geführt haben, daß anschließende Untersuchungen mit o. Tieren befriedigende Ergebnisse erbrachten.

Aus den anschließenden Ergebnissen mit o. Mäusen ist zu ersehen, daß in der "weiteren" Injektionsstelle immer, in der vermuteten "engeren" Injektionsstelle nur dreimal eine statistische Absicherung der Unterschiede zu den Kontrollwerten möglich war. Dies berechtigt zu der Annahme, daß sich die injizierte Hormonmenge vom Einstichgebiet aus in den umliegenden Muskelpartien verteilt hat und dort 6 Tage p.i. in höherer Konzentration vorlag als am direkten Injektionsort.

Beachtung verdienen ferner die Ergebnisse, daß mit o. Mäusen in fünf Gruppen sogar die Verfütterung von Versuchsproben aus der nicht injizierten Extremität zu einer signifikanten Erhöhung gegenüber den Kontrollwerten führte. Dies ist aus der Literatur nicht bekannt, jedoch wurde bisher nur mit n.o. Mäusen gearbeitet.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Untersucher (SCHAARSCHMIDT 1969) konnte in meinen Versuchen auch mit o. Mäusen in der von der Injektionsstelle weit entfernten Schultermuskulatur keine östrogene Aktivität ermittelt werden.

Parallelversuche mit n.o. Mäusen ergaben keine eindeutigen Ergebnisse; eine Aussage ist aufgrund der geringen Versuchsanzahl nicht möglich.

Abschließend sei eine Betrachtung der vorliegenden Versuchsergebnisse gestattet.

Es liegt die Vermutung nahe, daß ovariektomierte Mäuse generell zur Untersuchung auf östrogene Rückstände im Mäuseuterusgewichtstest weniger störanfällig auf Futterwechsel und einzelne Futterkomponenten reagieren als nicht ovariektomierte Mäuse. Diese Annahme erscheint besonders bei Versuchen mit Kalbfleisch begründet.

Die hier geschilderten Ergebnisse können nur orientierenden

Charakter haben. Versuchsreihen größerer Art sowohl für Kot als auch für Kalbfleisch würden eine bessere Absicherung der Ergebnisse gestatten.

Der Einwand des größeren Arbeitsaufwandes, den die Ovari-ektomie der Mäuse zur Folge hat, ist nach meinen Erfahrungen als gering zu bewerten. Eine eingearbeitete Person ist in der Lage, 30 bis 40 Mäuse pro Stunde zu operieren.

Steht eine Hilfsperson für die Narkose der Tiere zur Verfügung, so ist mit einer Anzahl von 40 bis 60 ovariektomierten Mäusen pro Stunde zu rechnen.

Die Mortalitätsquote post operationem lag bei mir unter 5%; die Anzahl der von mir insgesamt ovariektomierten Tiere betrug dabei 1200 bis 1500.

Auch müßten die Forderungen nach einer homogenen Zucht, die für die bisherige Anwendung mit juvenilen, nicht ovariektomierten Mäusen streng eingehalten werden muß, eingehend überprüft werden.

5. Zusammenfassung

Zum Nachweis östrogen wirksamer Substanzen in Geweben und Ausscheidungen von Schlachttieren ist im Rahmen der Fleischuntersuchung der Uterusgewichtstest mit juvenilen Mäusen empfohlen worden.

Um den Aussagewert dieses Testes zu prüfen, wurden Mäusegrundfutter, Kälberkot und Kalbfleisch mit und ohne definierte Zusätze von Diäthylstilböstrol (DÄS) auf ihre uterotrope Wirkung an der ovariektomierten und der nicht ovariektomierten juvenilen Maus überprüft.

Außer in experimentell kontaminiertem Untersuchungsmaterial sind in Paralleluntersuchungen Kot-, Fleisch- und Organproben eines männlichen Testkalbes, dem 50 mg DÄS i.m. appliziert worden waren, mit ovariektomierten Mäusen und nicht ovariektomierten Mäusen vergleichend untersucht worden.

Es erwies sich als störend, daß bereits geringfügige Änderungen in der Zusammensetzung der verabreichten Ration auch bei völliger Östrogenfreiheit bei nicht ovariektomierten Mäusen einen deutlichen uterotropen Effekt hatte.

Dieser Fehler konnte bei Ovariektomie der Mäuse, wie bei VOGT 1971 beschrieben, nicht beobachtet werden.

Die Technik der Ovariektomie ist relativ einfach, so daß sie durchaus für Routineuntersuchungen geeignet ist. Bei Einarbeitung in die Methode ist es möglich, 40 Mäuse und mehr in der Stunde zu ovariektomieren. Die Verlustrate liegt bei 5%. Zwischen dem 2. und 5. Tag post operationem eigneten sich ovariektomierte Mäuse am besten zum Versuchseinsatz. Dies gestattet eine gewisse Vorratshaltung für Routineuntersuchungen.

6. Summary

The use of the uterus test with immature mice for the detection of illegally administered estrogenic material in edible tissues and excreta of slaughter cattle has been recommended by LEC.

Commercial mice diet and muscle tissue of calves containing varying amounts of added DMS were given to immature and ovariectomized mice.

Furthermore the feces of a male calf, treated with 50 mg DMS i. m. were also fed to both, ovariectomized and non ovariectomized mice. After slaughter muscle tissue and organs were examined in the same way. A slight change in the composition of the diet without any estrogenic activity resulted in an increased uterus weight in the non ovariectomized mouse. This undesirable effect could be avoided by preceding ovariectomy (VOGT 1971).

The technique of ovariectomy is easy to handle in the routine-work. A skilled person may ovariectomize 40 mice and more per hour. The mortality rate is about 5%. The ovariectomized mice are best suited for the test 2-5 days following the operation. Thus it is possible to keep a limited stock of the ovariectomized animals.

7. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

ALLEN, E. u. E. DOISY

An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification and action in test animals

J. Amer. Med. Ass., 81, 819, (1923)

AMMON, R. u. W. DIRSCHERL

Fermente, Hormone und Vitamine und die Beziehungen dieser Wirkstoffe zueinander

Thieme, Leipzig, 3. Aufl., Bd. 3, S. 224, (1960)

ANDREWS, F.N., W.M. BEESON u. F.D. JOHNSON

The effect of stilbestrol, dienestrol, testosterone and progesterone on the growth and fattening of beef steers

J. Anim. Sci. 13, 99-107, (1954)

ASTWOOD, E. B.

A six-hour assay for the quantitative determination of estrogen

Endocrinology, 23, 25, (1938)

BÄR, F.

Tierarzneimittel und Aufzuchtmittel in der landwirtschaftlichen Praxis. Gesundheitliche Erwägungen zum Schutze des Konsumenten bei der Anwendung von Tierarzneimitteln und Aufzuchtmitteln in der landwirtschaftlichen Praxis

Medizin u. Ernährung 4, 96-98, T.2, (1963)

BIBRACK, B. u. G. BECK

Erfahrungen mit dem histologischen Nachweis östrogenbedingter Veränderungen in den akkessor. Geschlechtsdrüsen von Kälbern

Referat in Freiburg, 30.9.1971

Tagung der Sektion Lebensmittelhyg. der Dtsch. Vet. med. Gesellschaft (Masch-Schr.)

BORNSCHEIN, K.

Die Ausscheidung von synthetischem Follikelhormon im Harn und Kot bei Schafen und Ziegen nach parenteraler Verabreichung von Dienoestrol
Vet. med. Diss., München (1953)

BRÜGGEMANN, J. u. H. KARG

Hormone in der Tiermast in: 6. Symposion d. Dtsch. Gesellschaft f. Endokrinologie, Kiel 1959, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 195-206, (1960)

BRÜHANN, W.

Die Umsetzung von Erkenntnissen der Umweltforschung in Rechtsvorschriften, dargestellt am Beispiel von Lebensmitteln tierischer Herkunft
Arch. Lebensmittelhyg., 23, 83-85, (1972)

BUTENANDT, A.

Klinik und Forschung, 1, (1950)
zit. nach: AMMON, R. u. W. DIRSCHERL (1960)

BUTENANDT, A. u. E. ZIEGNER

Über die physiologische Wirksamkeit des kristallisierten, weiblichen Sexualhormons im Allen-Doisy-Test. Untersuchungen über das weibliche Sexualhormon (3. Mitt.)
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 188/189, 1, (1930)

CAIRY, C. F.

Hormones for growing and fattening animals
Vet.Med. 50, 339-346, (1955)

CAVALLI-SFORZA, L.

Biometrie, Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik
Fischer, Stuttgart, 2. Aufl., (1969)

CLEGG, M. T. u. H.H. COLE

The action of stilbestrol on the growth response in ruminants

J. Anim. Sci., 13, 108, (1954)

DODDS, GOLBERG, LAWSON u. ROBINSON

Nature, (London), 141, 247, (1938)

zit. nach: AMMON, R. u. W. DIRSCHERL (1960)

EULER, S.

Ein Beitrag zur oralen Stilbenbehandlung beim Rind

Vet.med. Diss., Zürich (1958)

EVANS, L. H.

Am. J. Physiol. 114, 297, (1936)

zit. nach: LICHTWITZ et al. (1951)

FRANK, R. T.

The ovary and the endocrinologist

J. Amer. Med. Ass. 78, 181, (1922)

GASSNER, F. X., R. P. MARTIN u. W. J. ALGEO

Hormone in der Tiermast

in: Moderne Entwicklungen auf dem Gestagengebiet.

Hormone in der Veterinärmedizin

6. Symposium d. Dtsch. Gesellsch. f. Endokrinologie,

Kiel 1959, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg,

151-194, (1960)

GEIGY

Wissenschaftliche Tabellen

J. R. Geigy AG., Pharm Abt., 7. Aufl., (1968)

GODGLÜCK, G. u. E. SIEWERT

Verfügbare Methoden zum Nachweis von Thyreostatika und Östrogenen im Rahmen der Fleischuntersuchung

Bundesgesdhl., 14, 213-217, (1971)

GODGLÜCK, G.

Rückstandsprobleme bei der großflächigen Bekämpfung von Krankheiten landwirtschaftlicher Nutztiere mit Arzneimitteln

Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 84, 486-489, (1971)

GOODYEAR, J. M. u. N. R. JENKINSON

Irridiation fluometric method of estimation of DES in beef liver tissue

Analyt. Chemistry, 33, 853, (1961)

GRAB, W.

Tierexperimentelle Untersuchungen über Cyren (Dioxydiäthyl-Stilben), einer synth. Verbindung mit der Wirkung des weiblichen Sexualhormons

Münch. med. Wschr., 86, 436, (1939)

GRÄTZ H. u. H. W. BIRKNER

Untersuchungen über die Möglichkeit einer Erkennung hormongemästeter Schlachtschweine im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung

Schlacht- u. Viehhof-Ztng., 2/1972

GRIFT, J. van der

Histologisch onderzoek van het tepelkanaal als methode voor het aantonen van het gebruik van oestrogene stoffen bij mestkalveren

Tschr. Diergeneesk., 92, 812-818, (1967)

GROBKLAUS, D.

Fremde Stoffe und gesundheitlich bedenkliche Rückstände im Geflügelfleisch

Bundesgesdbl., 15, 42-50, (1972)

HAMMER, C.

Modellversuche an Ratten zur Frage der Wirksamkeit minimaler Östrogendosierungen und von Tranquilizern auf Wachstum und endokrine Testesfunktion
Vet. med. Diss., München, (1965)

HEIM, E.

Ist Fleisch hormonal gemästeter Tiere gesundheitlich bedenklich
Fleischwirtsch., 7, 303-305, (1955)

HEINERT, H.

Nachweis von Östrogeneinwirkungen an Vorsteherdrüse und Harnröhrenzwiebeldrüse bei inländischen Schlachtkälbern
Fleischwirtsch., 51, 1793-1795, (1971)

HERLANT, M.

Les granulations acidophiles de l'hypophyse et leur signification physiologique
C.r.Soc.biol., 146, 1280, (1952)

HERLANT, M.

Mise en evidence de la somatotrophine dans les suspensions de granulations acidophile de l'hypophyse par son influence sur des cellules au pancreas
C.r.Acad.pc., 240, 1479, (1955)

HOLDEN, R. B.

Vascular reactions of the uterus of the immature rat
Endocrinology, 23, 539, (1939)

HUIS IN'T VELD, L. G., E. B. JONKMAN-VAN DEN BROEK u.
W. C. DE GROOT

Het gehalte aan stoffen met oestrogene werking in muskulatur en organen van kalveren na injectie van diaethylstilboestrol en hexoestrol
Tschr. Diergeneesk., 92, 805-812, (1963)

HUIS IN'T VELD, L. G., E. B. JONKMAN-VAN DEN BROEK,
W. C. DE GROOT u. C. LAAN

DES in weefsels en lichaamsvloeistoffen van mestkalveren
Tschr. Diergeneesk., 92, 1272-1281, (1967)

HUIS IN'T VELD, L. G., E. B. JONKMAN-VAN DEN BROEK,
W. C. DE GROOT u. H. O. KRÜSEL

Het gehalte aan stoffen met oestrogene werking in de
muskulatur van de injectie plaats en in de urine van
kalveren na toediening van diaethylstilboestrol en
hexoestrol

Tschr. Diergeneesk., 94, 169-178, (1969)

HUIS IN'T VELD, L. G., E. B. JONKMAN-VAN DEN BROEK
u. W. C. DE GROOT

Het residugehalte in organen, muskulatur, urine en
faeces van kalveren na orale en parenterale toediening
van diaethylstilboestrol

Tschr. Diergeneesk., 94, 998-1008, (1969)

HÖPKE, H. U.

Untersuchungen über die Eignung des Mäuseuterustestes
zum Nachweis von Substanzen mit östrogener Wirkung
im Fleisch

Zbl. Vet. Med., B, 19, 339-348, (1972)

JENSEN, E., M. NUMATA, J. BRECHER u. E. R. DESOMBRE

Hormone-receptor interaction as a guide to biochemical
mechanism

in: SMELLIE, R. M. S.: The biochemistry of steroid
hormone action

Acad. Press, London & New York, S. 133-156, (1971)

KARG, H.

Untersuchungen an Gonaden, Nebennierenrinden und Thymen
über einige endokrine Korrelationen sowie deren Bezie-
hungen zum Wachstum

Vet. med. Habil. Schrift München, (1958)

KARG, H.

Einsatz von Wirkstoffen in der Tierhaltung und endokrine
Testesfunktion

Tierärztl. Umschau, 19, 292-305, (1964)

KARG, H.

Hormonale Wirkstoffe in der Mast

Zschr. Tierzüchtg., Züchtungsbiol., 82, 154-168, (1966)

KARG, H.

Über Östrogene und Antiöstrogene im Futter

1. Mitteilung

Zschr. Tierzüchtg., Züchtungsbiol., 83, 21-27, (1967)

KARG, H.

Gedanken zum Rückstandsproblem nach Anwendung hormonaler
Wirkstoffe bei Nutztieren

Zschr. Tierphysiol., 23, 299-300, (1968)

KARG, H.

Praktische Durchführung des biolog. Testes (Mäuseuterus-
test) zur Bestimmung östrogener Fremdstoffe in Futter-
mitteln, Fleisch, Urin, Kot

Aus: Zur Vorlage bei der Kommission der Europ. Gemein-
schaften, Arbeitsgruppe Futtermittelrecht, Sachverstän-
digenausschuß für die Bestimmung von Stoffen mit horm.
Wirkung (1969)

KARG, H.

(Leseranfrage)

Tierärztl. Umschau, 26, 33, (1971)

KARG, H.

Östrogenrückstände und ihre Nachweismethoden

Referat auf der Fachtagung der Dtsch. Vet. med. Gesell-
schaft, Sektion Lebensmittelhyg., Freiburg 30.9.1971

(Masch.-Schr.)

KARG, H., H. SCHAARSCHMIDT u. M. WALDSCHMIDT

Bestimmung von Östrogenen im Kot, Harn und Fleisch zum Nachweis illegaler Östrogenbehandlung von Mastkälbern
Referat auf d. 5. Symposium der Weltvereinigung tierärztl. Lebensmittelhygieniker, Opatja, (1969)

KARG, H., H. SCHAARSCHMIDT u. M. WALDSCHMIDT

Versuche zum Nachweis der illegalen Anwendung von DÄS bei männl. Mastkälbern
Arch. Lebensmittelhyg., 21, 1-13, (1970)

KARLSON, P.

Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 5. Aufl.,
Thieme, Stuttgart, (1966)

KLEIN, D.

Der Hemmstoff- und Hormonnachweis bei Schlachttieren
Tierärztl. Umschau, 27, 24-28, (1972)

KOCH, W.

Die Wirkung von hochdosierten Östrogenen auf Säugetiere und Vögel
in: 2. Symposium d. Dtsch. Gesellschaft f. Endokrinologie
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, S. 58, (1955)

KOCH, W. u. G. HEIM

Die Speicherung von Östrogenen im Tierkörper
Endokrinologie, 29, 288, (1952)
" 30, 335, (1953)
" 32, 148-151, (1955)

KRAUSE, E.

Zum Vorkommen östrogenwirksamer Stoffe in Futterpflanzen
Arch. exp. Vet. med., 23, 481-487, (1969)

KRAUSE, E.

Hormonell wirksame Stoffe in Futterpflanzen
M. H. Vet. Med., 25, 148-157, (1970)

KROES, R.

Volksgezondheidsaspecten by oestrogeentoediening aan mestkalveren en histologische methoden van onderzoek om toediening van oestrogenen aan te tonen
Tschr. Diergeneesk., 96, 1196-1205, (1971)

KRÖLLER, E.

Zum Nachweis von DÄS im Fleisch
Dtsch. Lebensmittel. Rdsch., 67, 120, (1971)

KUSCHINSKY, G. u. H. LÜLLMANN

Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie, 3. Aufl.,
Thieme, Stuttgart, (1967)

KÜPFER, U.

Sexualaktive Substanzen in Pflanzen - eine Literaturstudie
Schweiz. Arch. Tierhk., 112, 72-76, (1970)

LAQUEUR, E., P. C. DINGENASE, S. E. HART DE JONGH

Über das Vorkommen weibl. Sexualhormons (Menform) im Harn von Männern
Klin. Wschr., 6, 1859, (1927)

LAWRIE, R. A.

Über einige Auswirkungen von Hormonimplantationen auf die Zusammensetzung der Muskulatur (Some effect of hormone implanting on muscle composition)
Fleischwirtsch., 11, 933, (1959)

LERCHE, M. u. H.-J. SINELL

Untersuchung über Schlachtwert und Fleischqualität von Jungbullen und Ochsen nach hormonaler Mästung
Zbl. Vet. Med., 6, 292, (1959)

LICHTWITZ, A. G., G. THIEKY, R. PALIER u. M. DELAVILLE

Les hormones génitales et le cartilage de conjugation
Sem. hôp., 6, (1951)

LORENZ, F. W.

Effects of estrogens on domestic fowl and application
in the poultry industry
Vitamines and hormones, 12, 235, (1954)

MALANOSKI, A. J.

Regulatory control of hormone residues by chemical
analysis
J. Assoc. Offic. Analyt. Chem., 53, 226-228, (1970)

MANTEL, Th.

Die Absicherung des Mäuseuterustestes zum Nachweis von
Östrogenen im Fleisch
Vortrag Arbeitskreis lebensmittelhyg.-tierärztlicher
Sachverständiger (6.4.1972/Berlin)
(Masch.-Schr.)

MARTIN, L.

The use of 2-3-5-triphenyltetrazolium chloride in the
biological assay of oestrogens
J. Endocr., 20, 187-197, (1960)

MØLLER, K.

Pharmakologie, 5. Aufl.,
Schwabe, Basel/Stuttgart, (1966)

NEUHOFF, H.

Die hormonale Kapaunisierung unter besonderer Berücksich-
tigung der Fleischqualität und der Resorption des
Diaethyl-dioxy-stilben
Vet. med. Diss., München 1952

NITSCHKE, Th. u. G. FABIAN

Messungen am Endometrium der Maus in den Zyklusphasen
Zbl. Vet. Med., A, 17, 216-229, (1970)

PRÄNDL, O.

Aus: Frühe Stoffwechselwirkungen von Östradiol auf tier.
Muskulatur (von H. GÜNTHER)
Arch. Lebensmittelhyg., 15, 157-160, (1964)

ROMMEL, W.

Klinische Diagnostik am Genitale des weiblichen Rindes
Fischer, Jena, (1963)

RUITENBERG, E. J., R. KROES, J. BERKVENES

Histologische onderzoeken van de prostaat als controle
middel op de toediening van oeströgenen by het kalf
Tschr. Diergeneesk., 92, 819-827, (1967)

RUITENBERG, E. J., R. KROES, J. BERKVENES

Evaluation of the "prostate test" in checking the admini-
stration of oestrogens in the calf
Zbl. Vet. Med., A, 17, 351, (1970)

RUITENBERG, E. J., J. BERKVENES, L. G. HUIS IN'T VELD, et al.

Untersuchungen über das Vorkommen uterotroper Stoffe im
Kalbfleisch
Fleischwirtsch., 52, 64-66, (1972)

SCHAAL, E.

Östrogene und Versuche zu ihrem Nachweis in Geflügel-
fleisch
Dtsch. Lebensmittel. Rdsch., 59, 37-39, (1963)

SCHAAL, E. u. I. KLEIKAMP

Untersuchungen über den Nachweis von Östrogenen im Fleisch
Dtsch. Lebensmittel. Rdsch., 63, 325-328, (1967)

SCHAARSCHMIDT, H.

Morphologische und biologische Nachweismethoden der
Östrogenbehandlung von Mastkälbern
Vet. med. Diss., München 1969

SCHOOP, G. u. H. KLETTE

Östrogene in Futterpflanzen

Dtsch. Tierärztl. Wschr., 62, 461, (1955)

SCHRÖDER, K.

Zum Nachweis östrogenwirksamer Rückstände in chemisch
kapaunisierten Schlachthähnchen

Vet. med. Diss., München 1965

SCHULLER, P. L.

The detection of diethylstilbestrol (DES) in urine by
thinlayer chromatography

J. Chromatogr., 31, 237, (1967)

SIEWERT, E.

Kritische Bewertung des Mäuseuterustestes

Vortrag Arbeitskreis lebensmittelhyg.-tierärztlicher
Sachverständiger (11.11.1971/Berlin)

(Masch.-Schr.)

SINELL, H.-J.

Diskussion in "Östrogene in der Tiermast"

Arch. Lebensmittelhyg., 15, 132, (1964)

STOB, M., F. N. ANDREWS, M. X. ZARROW u. W M. BEESON

Estrogenic activity of the meat of cattle, sheep and
poultry following treatment with synthetic estrogens
and progesterone

J. Anim. Sci., 13, 138-151, (1954)

STROUD, S. W.

Recovery of injected estrogenic substances from rabbit
urine

J. Endocr., 1, 201, (1939)

THIEL, W. u. E. SCHAAAL

Untersuchungen über den Nachweis von östrogenen Stoffen
in tier. Lebensmitteln, insbesondere in Geflügelfleisch
1. u. 2. Mitt. Fleischwirtsch., 14, 400-404; 1155- 1158,
(1962)

THIEL, W.

Bestimmung östrogenen Fremdstoffe in Futtermitteln,
Fleisch, Kot und Urin von Mastkälbern nach einem ein-
heitlichen biologischen Test
Fleischwirtsch., 51, 905-907, (1971)

TIECCO, G. u. L. BELLANI

Ricerca degli estrogeni sintetici negli alimenti
Nota 3
Vet. ital., 12, 447, (1961)

TIECCO, G.

Dosages des substances à effet estrogène
EEG-Dokument 9164/6/68-F (1968)

TURNER, W. CHAS

Feeding Diethylstilbestrol to cattle
Vet. Med., 50, 393, (1955)

UMBERGER, E. J. u. G. H. GASS

The effect of dietary fat on the uterine weight response
of immature mice to oral stilbestrol
Endocrinology, 63, 801-805, (1958)

UMBERGER, E. J., G. H. GASS u. J. M. CURTIS

Design of a biological assay method for the determination
of estrogenic residues in the edible tissues of domestic
animals treated with estrogens
Endocrinology, 63, 806-815, (1958)

UMBERGER, E. J., D. BANES, F. M. KUNZE u. S. H. COLSON

Chemical determination of diethylstilbestrol residues
in the tissue of treated chickens

J.A.O.A.C., 46, 472, (1963)

VOGT, K., H. KARG u. G. H. GASS

Nutritiv bedingte uterotrope und antiuterotrope Effekte
bei juvenilen Mäusen 1. Die Wirkung von Milchprodukten
und Vollmilchaustauschfuttermitteln

Zschr. Tierphysiol., 25, 333-344, (1969)

VOGT, K., M. WALDSCHMIDT u. H. KARG

Bestimmung von Ausscheidungsverlauf und Rückständen von
Diäthylstilböstrol nach intramuskulärer Verabreichung
beim Kalb mit Hilfe biologischer und chemischer Nachweis-
verfahren

Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 83, 457, (1970)

VOGT, K. u. H. KARG

Nutritiv bedingte uterotrope und antiuterotrope Effekte
bei juvenilen Mäusen

2. Die Wirkung von Eigelb, Fleisch, Fetten, Ölen, Voll-
milchaustauscher und Sacchariden in Verbindung mit unter-
schiedlichem Grundfutter

Zschr. Tierphysiol., 28, 1-12, (1971)

VOGT, K., M. WALDSCHMIDT u. H. KARG

Bestimmung von Ausscheidungsverlauf und Rückständen von
Östradiol beim Kalb nach intramuskulärer bzw. s.c. Im-
plantation von Preßlingen mit entsprechendem Östrogen-
gehalt

Arch. Lebensmittelhyg., 23, 70-76, (1972)

VUILLAUME, R.

L'emploi des oestrogènes en élevage; situation en 1970

Rec. Med. Vet., 146, 395-400, (1970)

WAL, P. VAN DER, K. K. VAN HELLEMOND u. P. L. M. BERENDE
De toepassing van oestrogenen by de vleesprodukten
Tschr. Diergeneesk., 96, 1173-1190, (1971)

WALDSCHMIDT, M.

Einfacher, dünnschichtchromatographischer Screening-
Test zur Differenzierung von Östrogenen in Extrakten
Referat, gehalten auf der Fachtagung der Dtsch. Vet.
med. Gesellschaft, Sektion Lebensmittelhyg., Freiburg
30.9.1971
(Masch.-Schr.)

WIBERG, G. S. u. N. R. STEPHENSON

The detection of estrogenic activity in tissues of
steers which have been fed diethylstilbestrol
Canad. J. Biochem. Physiol., 35, 1107, (1957)

WRENN, T. R., J. BITMAN u. J. R. WOOD

Influence of local estrogen administration on vaginal
glycogen
Endocrinology, 81, 819, (1923)

ZUNDEL, G., P. RINJARD u. A. QUEVAUVILLER

Dépistage rapide du traitement oral ou parentéral des
poulets par des oestrogènes synthétique ou naturele
Ann. Fal. Exp. Chimiques, 57, 144-152, (1964)

Kurzmeldungen USA: Fast alle US-Rinder werden mit Wachstums-
hormon gefüttert

AGRA-Europe 30/71 27. 7. 1971

Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Sinell danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Abfassung dieser Dissertation.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dieter Großklaus für die Bereitstellung von Arbeitsplatz und Material sowie die jederzeit gewährte Unterstützung im Robert von Ostertag-Institut des Bundesgesundheitsamtes Berlin.

Herrn Dr. Eike Siewert danke ich für die jederzeit gewährte Unterstützung und seine großzügige Hilfe.

Ferner gilt mein Dank allen übrigen Mitarbeitern des Institutes für Lebensmittelhygiene der Freien Universität Berlin sowie des Robert von Ostertag-Institutes des Bundesgesundheitsamtes Berlin.

L e b e n s l a u f

27. 1. 1947 geboren als Tochter des Kurt Hahn
und seiner Ehefrau Charlotte, geb.
Duwe, in Gronau/Hann.
- 1966 Abitur
- 1966 bis 1971 Studium der Veterinärmedizin an der
Freien Universität Berlin
- 1968 Physikum
13. 5. 1971 III. Abschnitt der Tierärztlichen
Prüfung
25. 5. 1971 Bestallung als Tierärztin
- seit Mai 1971 Assistent am Institut für Lebens-
mittelhygiene der Freien Univer-
sität Berlin

